

CRISTINA APARECIDA ARRIVABENE CARUY

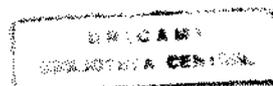
EFEITOS HEPÁTICOS DA ASSOCIAÇÃO DE ANESTÉSICOS VOLÁTEIS E PARACETAMOL; ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutora em Medicina, na área de Clínica Médica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Neusa Júlia Pansardi Pavani

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elza Cotrim Soares

**Campinas
1998**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	C252e
V.	Es.
T.º MED.	BC/35741
PROJ.	395/98
C.º	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/11/98
N.º CPU	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM-00118289-5

C252e

Caruy, Cristina Aparecida Arrivabene
Efeitos hepáticos da associação de anestésicos voláteis e
paracetamol: estudo experimental em ratos / Cristina Aparecida
Arrivabene Caruy. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientadores : Neusa Júlia Pansardi Pavani, Elza Cotrim Soares
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Anestesia por inalação. 2. Fígado. 3. Acetaminofen. 4.
Toxicidade. I. Neusa Júlia Pansardi Pavani. II. Elza Cotrim Soares.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

BANCA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aluno(a) CRISTINA APARECIDA ARRIVABENE CARUY

Orientador (a) NEUSA JÚLIA PANSARDI PAVANI

Neusa J P Pavani

1. *Jmb*
2. *J. Zair*
3. *J. Zair*
4. *R. Zair*
- 5.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, área de Clínica Médica.

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Tufi (in memoriam) e Juñória. Todo e qualquer agradecimento que eu faça a estas duas pessoas será sempre pouco, perto do muito que eles sempre me ofereceram.

AGRADECIMENTOS

À minha querida irmã, Maria Bege, pelo amor, carinho, amizade e estímulo constante em todos os momentos da minha vida.

A todos os familiares que, afetivamente, acompanharam as etapas deste trabalho, em especial a Henrique, Pedro, Murilo, Laila, Vítor e minhas tias, Aracy, Ignez e Idalina.

À Prof^ª Dr^ª Neusa Júlia Pansardi Pavani, pela amizade, carinho, dedicação e responsabilidade com que conduziu todos os estágios desta pesquisa.

À Prof^ª Dr^ª Elza Cotrim Soares, pelo apoio e preciosa contribuição.

Ao Prof. Adilson Roberto Cardoso, pela amizade sincera, colaboração em todas as fases deste trabalho e pela responsabilidade em minha formação como anesthesiologista.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, pela incalculável contribuição e palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, pelo apoio constante.

À Prof^ª Dr^ª. Cecília Amélia Fazio Escanhoela, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas, pela cuidadosa avaliação histológica, pelo carinho e amizade.

À Dr^ª Lúcia Simas Parentoni, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas, pela contribuição na avaliação bioquímica, pelo apoio e estímulo constantes.

À Sueli Moreira de Mello, supervisora do Laboratório de Toxicologia do Hospital das Clínicas, pela prestimosa colaboração nas dosagens plasmáticas de paracetamol, e pelo grande incentivo.

À minha grande amiga, Thais Brassaloti, pelo apoio, carinho, paciência e estímulo constante.

Aos meus amigos e colegas de plantão que, na fase final desta trajetória, pouparam-me de tantas noites em claro.

Ao anesthesiologista Eduardo de Carvalho Balesteiro Aleixo, pelas horas que dedicou auxiliando-me na elaboração dos gráficos.

Aos colegas da Comissão de Pesquisa, em especial ao estatístico Estevão Freitas de Souza, pelo carinho, atenção, disponibilidade e inestimável ajuda.

À Gracinda de Lourdes Jorge, biomédica do Laboratório de Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia da Universidade Estadual de Campinas, pelo valioso auxílio durante a fase experimental desta pesquisa, pelo carinho e amizade.

Aos biólogos William Adalberto Silva e Ana Cristina de Moraes, do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, pela valiosa colaboração, pelo carinho e dedicação com que me ensinam a arte de lidar com os animais.

À Gisele Clotilde Ferreira, técnica do Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela colaboração e grande auxílio na confecção das lâminas.

À Seção de Apoio Didático, pela prestimosa colaboração.

Pai,

*não há palavras que possam traduzir a tristeza de
não tê-lo comigo neste momento.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	64
8. SUMMARY.....	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
10. ANEXOS.....	83

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
ANOVA	análise de variância
Br	bromo
C	carbono
CAM	concentração alveolar mínima
CDF	clorodifluoretano
Cl	cloro
cm	centímetro
CTF	clorotrifluoretano
DP	desvio padrão
FA	fosfatase alcalina
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
F	flúor
G	grupo
g	grama
GGT	gama-glutamilttransferase
H	hidrogênio
IRL	intervalo de referência laboratorial

l	litro
LDH	lactato desidrogenase
MDH	malato desidrogenase
min	minuto
ml	mililitro
mmHg	milímetro de mercúrio
NAD ⁺	dinucleotídeo nicotinamida adenina oxidado
NADH	dinucleotídeo nicotinamida adenina reduzido
O ₂	oxigênio
p	valor de significância estatística
P _a O ₂	pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
P _a CO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
RIL	reação inflamatória lobular
RIP	reação inflamatória portal
T°	temperatura
TFA	ácido trifluoracético
U/L	unidade por litro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VC	vacuolização citoplasmática

VCL	veia centrolobular
VRL	valor de referência laboratorial
vs	versus
\bar{X}	média
μg	micrograma
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	grau centígrado

LISTA DE FIGURAS

Figura I - Fórmula estrutural do halotano.....	9
Figura II - Biotransformação do halotano.....	11
Figura III - Fórmula estrutural do isoflurano.....	13
Figura IV - Biotransformação do isoflurano.....	14
Figura V - Fórmula estrutural do sevoflurano.....	15
Figura VI - Biotransformação do sevoflurano.....	16
Figura VII- Fórmulas estruturais do paracetamol, acetanilida e fenacetina.....	18
Figura VIII- Metabolismo do paracetamol.....	19
Figura IX - Representação gráfica da dispersão dos valores de AST nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	34
Figura X - Representação gráfica da dispersão dos valores de ALT nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	35
Figura XI - Representação gráfica da dispersão dos valores de FA nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	37
Figura XII - Representação gráfica da dispersão dos valores de GGT nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	38
Figura XIII - Valores médios da concentração plasmática de paracetamol nos grupos 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	40
Figura XIV - Frequência (%) dos graus de necrose observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	42

Figura XV - Freqüência (%) dos graus de vacuolização citoplasmática observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	43
Figura XVI - Microscopia óptica de fragmento hepático de rato do grupo 4 apresentando vacuolização citoplasmática.....	44
Figura XVII - Freqüência (%) dos graus de congestão observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	45
Figura XVIII – Microscopia óptica de fragmento de rato do grupo 4, apresentando congestão.....	46
Figura XIX - Freqüência (%) dos graus de reação inflamatória lobular observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	47
Figura XX – Microscopia óptica de fragmento hepático de rato do grupo 4, apresentando focos de necrose e de reação inflamatória lobular.....	48
Figura XXI - Freqüência (%) dos graus de reação inflamatória portal observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).....	49

Resumo

Altas doses de paracetamol podem causar efeitos tóxicos no fígado. Os anestésicos voláteis também podem causar hepatotoxicidade, por efeito direto ou através dos metabólitos que produzem.

Neste trabalho, procurou-se avaliar os efeitos da associação dos voláteis, halotano, isoflurano e sevoflurano, com o paracetamol, em ratos não submetidos à hipoxia e mantidos em ventilação espontânea.

Foram incluídos no estudo 94 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, com peso entre 260 e 290 g. Destes, 38 foram utilizados na determinação dos valores e intervalos de referência laboratoriais. Os demais foram distribuídos em sete grupos de oito animais cada.

Nos grupos um, dois e três, foram administradas, respectivamente, uma CAM (concentração alveolar mínima) de halotano, de isoflurano e de sevoflurano. Esses anestésicos foram vaporizados em oxigênio a 100%, durante 60 minutos, por cinco dias consecutivos.

Nos grupos quatro, cinco e seis, após mesmo procedimento com halotano, isoflurano e sevoflurano, respectivamente, foi administrado paracetamol na dose diária de 500 mg/kg de peso, através de sonda orogástrica, por cinco dias consecutivos.

No grupo sete, administrou-se paracetamol isoladamente, em dose diária única de 500 mg/kg.

No quinto dia de acompanhamento, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico endovenoso (20 mg/kg). Após laparotomia, 3 ml de sangue foram coletados da aorta, para dosagens das enzimas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, fosfatase alcalina - FA e gama-glutamilttransferase - GGT) e para determinação das concentrações plasmáticas de paracetamol. Fragmentos de fígado foram fixados em formalina para posterior estudo histológico.

Na análise clínica dos resultados, observou-se a ocorrência de alterações enzimáticas isoladas em todos os grupos estudados, quando os intervalos de referência

laboratoriais foram utilizados como parâmetros. Estatisticamente, a associação halotano e paracetamol aumentou a AST e a ALT, mas não alterou a FA. Houve aumento da GGT, devido ao efeito isolado do halotano. Não houve aumento da necrose nem da reação inflamatória portal. O aumento da vacuolização citoplasmática foi devido ao efeito isolado do halotano. Houve aumento da congestão, da reação inflamatória lobular e da concentração plasmática de paracetamol.

A associação isoflurano e paracetamol aumentou a ALT, mas não alterou a FA. Houve aumento da AST e da GGT, devido ao efeito isolado do isoflurano. Não houve aumento da necrose nem das reações inflamatórias lobular e portal. Houve aumento da vacuolização citoplasmática, devido ao efeito isolado do isoflurano. Houve aumento da congestão e da concentração plasmática de paracetamol.

A associação sevoflurano e paracetamol não alterou as enzimas estudadas. Não houve aumento da necrose nem das reações inflamatórias lobular e portal. Houve aumento da vacuolização citoplasmática, devido ao efeito isolado do sevoflurano. Houve aumento da congestão, mas não da concentração plasmática de paracetamol.

1. Introdução

O fígado desempenha importante papel na biotransformação de drogas, podendo resultar em desintoxicação, conversão de precursores biologicamente inativos a compostos ativos ou formação de produtos tóxicos a partir de substratos inativos. O resultado final depende do composto em questão, do estado metabólico do fígado e da suscetibilidade individual (MALTZ, 1990).

De todos os anestésicos voláteis em uso atualmente, o halotano é o que causa maior preocupação no que diz respeito à hepatotoxicidade. Apesar de ter sido amplamente utilizado por, aproximadamente, 30 anos, a maior razão para o declínio da popularidade do halotano é a sua associação com hepatotoxicidade (WOOD, 1990). Segundo KENNA & JONES (1995), esta deve ser a razão provável pela qual muitos anestesiólogistas escolhem o isoflurano ou o sevoflurano como anestésicos inalatórios em adultos. Em pesquisa realizada no Reino Unido, nos primeiros seis meses de 1994, o halotano foi utilizado em menos de 20% dos procedimentos envolvendo o uso de anestésicos voláteis.

Durante a década de 1978-1987, o Comitê Dinamarquês de Reações Adversas a Drogas recebeu 1.100 relatos de lesão hepática produzida provavelmente por drogas. Destes casos, 286 foram relacionados aos anestésicos voláteis, sendo que 280 (25,5%) foram atribuídos ao halotano. O paracetamol foi responsabilizado por 18 casos (1,6%). Dos 1.100 relatos, 52 foram fatais e, entre estes, 14 (27%) tiveram o halotano como responsável e 3 (5,7%), o paracetamol (FRIIS & ANDREASEN, 1992).

Existe controvérsia sobre a causa da lesão hepatocelular e vários modelos animais têm sido desenvolvidos na tentativa de definir o mecanismo pelo qual o halotano possa ser hepatotóxico. Todos dizem respeito à estimulação da via reductiva do metabolismo, associando este agente a drogas indutoras enzimáticas ou hipoxia (McLAIN, SIPES, BROWN JR, 1979; BROWN JR, 1988). Outros estudos relatam que a toxicidade não é atribuída somente ao composto, mas também aos metabólitos tóxicos produzidos pela biotransformação do mesmo. Eles formam conjugados de hapteno-proteína (antígenos), levando à necrose hepática mediada imunologicamente (WOOD, 1990).

Ainda existem dúvidas, em Anestesiologia, se os mais recentes anestésicos inalatórios possuem características indesejáveis, semelhantes às do halotano, com relação ao fígado.

O isoflurano é um anestésico volátil bastante utilizado na prática clínica. Poucos relatos de hepatotoxicidade são descritos após a sua administração, podendo-se considerar o potencial hepatotóxico do mesmo como pequeno ou inexistente (BROWN JR, 1988).

Segundo STRUM *et al.* (1987), o sevoflurano, um dos mais recentes agentes anestésicos voláteis utilizados na prática clínica, também pode causar hepatotoxicidade na vigência de hipoxia.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de estudar a influência dos anestésicos voláteis no fluxo sanguíneo hepático (HUGHES, CAMPBELL, FITCH, 1980; GELMAN, FOWLER, SMITH, 1984a; FRINK, GHANTOUS, MALAN, 1992a; FRINK *et al.*, 1992b; CRAWFORD *et al.*, 1992a, b). STEFFEY (1996) concluiu que todos os agentes anestésicos voláteis podem causar lesão hepatocelular, devido à redução do fluxo sanguíneo hepático e conseqüente diminuição do transporte de oxigênio (O₂) para o fígado. Alterações do fluxo sanguíneo hepático e da oxigenação podem causar lesão hepatocelular e alterações na função e no "clearance" hepáticos de drogas.

O paracetamol é um analgésico e antipirético bastante utilizado na prática clínica. Devido à sua relativa segurança e ausência de efeitos colaterais, quando utilizado em doses terapêuticas, tem se tornado substituto da aspirina (GOLFRANK *et al.*, 1990).

A segurança do paracetamol tem sido demonstrada em pacientes com alergia à aspirina (SETTIPANE, 1981), discrasias sanguíneas (MIELKE, 1981) e distúrbios gastrintestinais (JICK, 1981). Apesar de seguro, doses maiores que 7,5 gramas, ou 140 mg/kg em indivíduos adultos, podem ser hepatotóxicas (GOLDFRANK *et al.*, 1990). Para WHITCOMB & BLACK (1994), doses a partir de 15 gramas em humanos podem resultar em hepatotoxicidade.

A toxicidade do paracetamol é previsível, dose-dependente e relaciona-se com o próprio metabolismo desta substância. Um dos responsáveis pela ocorrência de lesão hepática causada por esta droga é o citocromo P-450, o qual induz a síntese de metabólitos tóxicos que podem causar hepatotoxicidade. Portanto, drogas indutoras enzimáticas, tais

como fenobarbital e etanol, podem aumentar a hepatotoxicidade dessa substância (MALTZ, 1990).

O paracetamol é uma hepatotoxina intrínseca e seu mecanismo de ação pode envolver ataque direto ao hepatócito ou acúmulo de metabólitos tóxicos. O halotano é uma hepatotoxina idiossincrásica, com toxicidade imprevisível e não relacionada à dose, podendo ocorrer tanto uma reação de hipersensibilidade generalizada, como uma hepatotoxicidade isolada, dependendo do hospedeiro (MALTZ, 1990).

GOLDFRANK *et al.* (1990) e MALTZ (1990) alertam para o uso abusivo de paracetamol em indivíduos que estão utilizando concomitantemente drogas hepatotóxicas, citando o halotano como uma delas.

Vários estudos têm demonstrado que o halotano pode influenciar a biodisponibilidade de drogas em animais e humanos, mas este mecanismo permanece obscuro (BROWN JR, 1971, 1972; WOOD & WOOD, 1984; REILLY *et al.*, 1985)

A presente investigação espera contribuir para o esclarecimento dos efeitos hepáticos de repetidas exposições de ratos, mantidos em ventilação espontânea com O₂ a 100%, aos agentes anestésicos voláteis (halotano, isoflurano e sevoflurano) associados a altas doses de paracetamol, droga amplamente utilizada no tratamento de dores agudas e crônicas.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos hepáticos produzidos por exposições repetidas de ratos, não submetidos à hipoxia e mantidos em respiração espontânea enriquecida com O₂ a 100%, aos anestésicos voláteis (halotano, isoflurano, sevoflurano) em associação com paracetamol.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos bioquímicos.
- Avaliar os efeitos histológicos.
- Avaliar os efeitos sobre a concentração plasmática de paracetamol.

3. Revisão da literatura

Os anestésicos inalatórios voláteis hidrocarbonetos halogenados são compostos que surgiram em meados do século XIX. Desde o início da utilização do clorofórmio como agente anestésico, em 1847, os hidrocarbonetos halogenados têm desempenhado um papel importante na prática clínica. Vários hidrocarbonetos clorados foram pesquisados. Em 1894, Carlson utilizou clinicamente o cloreto de etila. Em 1926, um derivado bromado do etanol, o tribromoetanol, foi introduzido por Duisberg. Pouco tempo depois, Molitor investigou a farmacologia do tricloroetanol. Devido às características tóxicas destas substâncias, a maioria dos médicos descartou o uso das mesmas.

Na busca por compostos mais estáveis, Moissan em 1886, isolou o flúor, o mais ativo dos halogênios. A adição de um átomo de flúor a um composto produz uma substância química facilmente hidrolisável, porém, os difluorados são bastante estáveis, enquanto que os trifluorados são extraordinariamente estáveis, pois a fluoração confere estabilidade ao composto. Estudos pioneiros com os hidrocarbonetos fluorados começaram entre 1940 e 1950, com Robbins. Investigações subseqüentes focalizaram agentes específicos, tais como as feitas por Krantz e Sadove sobre o fluoroxeno, em 1953, e por Raventos e Suckling, sobre o halotano, em 1956 (COLLINS, 1978).

Posteriormente, vários compostos hidrocarbonetos foram introduzidos na prática clínica, buscando-se estabelecer o equilíbrio entre potência anestésica, ausência de inflamabilidade, segurança e menores efeitos colaterais.

Faz-se, a seguir, uma descrição pormenorizada dos anestésicos voláteis halogenados e do paracetamol, dando ênfase aos aspectos relacionados ao o presente estudo.

3.1. HALOTANO

O halotano (2-bromo 2-cloro 1,1,1 trifluoretano – $\text{CF}_3\text{-CHClBr}$) foi sintetizado por Suckling, na Inglaterra, em 1951, e utilizado pela primeira vez na prática clínica em 1956 (COLLINS, 1978). Foi rapidamente aceito pelos anestesiológicos pelo fato de não ser

inflamável, possuir baixa solubilidade, promover rápida indução, relaxamento muscular satisfatório e apresentar baixa incidência de náuseas e vômitos (STEVENS & KINGSTON, 1996). A fórmula estrutural do halotano está representada na Figura I.

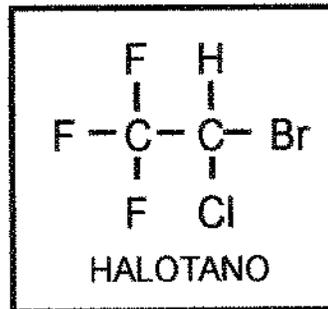


Figura I: Fórmula estrutural do halotano.

A partir do início da utilização desta substância na prática anestesiológica, surgiram, na literatura, vários relatos clínicos de icterícia e necrose hepática no pós-operatório, resultando, em 1966, no “Estudo Nacional do Halotano”, patrocinado pela Academia Nacional de Ciências e pelo Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos da América. Este projeto teve o objetivo de verificar a incidência de tais complicações, comparando o halotano a outros agentes inalatórios (GALL, 1968).

Alguns fatores têm sido relacionados ao aumento do risco de hepatotoxicidade em humanos após anestesia com halotano. São eles: exposições múltiplas (WRIGHT *et al.*, 1975; TROWELL, PETO, SMITH, 1975; ALLEN & DOWNING, 1977; NEUBERGER & WILLIAMS, 1984); obesidade (WALTON *et al.*, 1976; SARAIVA *et al.*, 1977; BENTLEY *et al.*, 1982); idade (LEWIS & BLAIR, 1982); sexo (BENJAMIN *et al.*, 1985); fatores genéticos (SCHEMEL, 1976; ZARIC *et al.*, 1986); hipoxia; doenças hepáticas pré-existent; indução enzimática e redução da perfusão hepática (WOOD, 1990).

Conceitos atuais, propostos por FRINK JR (1995), a respeito da hepatotoxicidade do halotano evidenciam: biotransformação, formando um ou vários metabólitos que têm, no mínimo, moderado grau de reação com proteínas; ligações

covalentes deste(s) metabólito(s) com proteínas hepáticas, formando um hapteno; produção de uma resposta imune a este hapteno, em certos indivíduos suscetíveis, levando a necrose hepatocelular.

GELMAN (1996) propõe três teorias para explicar a hepatotoxicidade induzida pelo halotano:

1. Teoria Metabólica: em animais, como ratos, e em alguns pacientes que desenvolvem lesão hepática, existe uma habilidade em biotransformar o anestésico pela via reductiva, produzindo intermediários tóxicos reativos. Todos os anestésicos voláteis têm um grau de metabolização, e o citocromo P-450 tem papel fundamental nesta biotransformação. Exposição a várias drogas induz o sistema microssomal hepático, aumentando a quantidade de enzimas, com subsequente aumento da razão de transformação do substrato em produto.
2. Teoria da Privação de O₂: a hipoxia pode ter papel importante, ou até principal, em algumas formas de lesões hepáticas causadas pelo halotano. Várias observações feitas em animais, explicadas pela Teoria Metabólica, podem ser atribuídas à privação de O₂ hepático, sem envolvimento direto da biotransformação reductiva do halotano. Segundo NAGANO *et al.* (1990), aparentemente o halotano diminui a demanda de O₂ hepático, o que sugere um mecanismo protetor que pode reduzir a lesão produzida pela hipoxia. No entanto, evidências sugerem que o halotano diminui o suprimento de O₂ hepático em um grau maior que a demanda e, por esta razão, não oferece nenhuma proteção ao fígado contra a hipoxia.
3. Teoria Imunológica: o envolvimento de hipersensibilidade e idiosincrasia na hepatite por halotano tem sido postulado com base em importantes observações, que incluem associação com múltiplas exposições; febre após primeira exposição, seguida de icterícia na exposição seguinte; associação de febre com eosinofilia, história freqüente de alergia a outras drogas e demonstração de anticorpos circulantes. Esta teoria assume que um dos mecanismos de lesão hepática envolve os metabólitos intermediários produzidos pela via oxidativa do metabolismo do halotano, que podem ligar-se

covalentemente ao tecido hepático (proteínas ou lipoproteínas), como haptenos, formando complexos que podem produzir resposta imunológica em indivíduos suscetíveis (BROWN & GANDOLFI, 1987).

REHDER *et al.* (1967) demonstraram que o halotano sofre grande metabolização em humanos e aproximadamente 20 % do que é absorvido, é biotransformado. A Figura II ilustra a biotransformação do halotano.

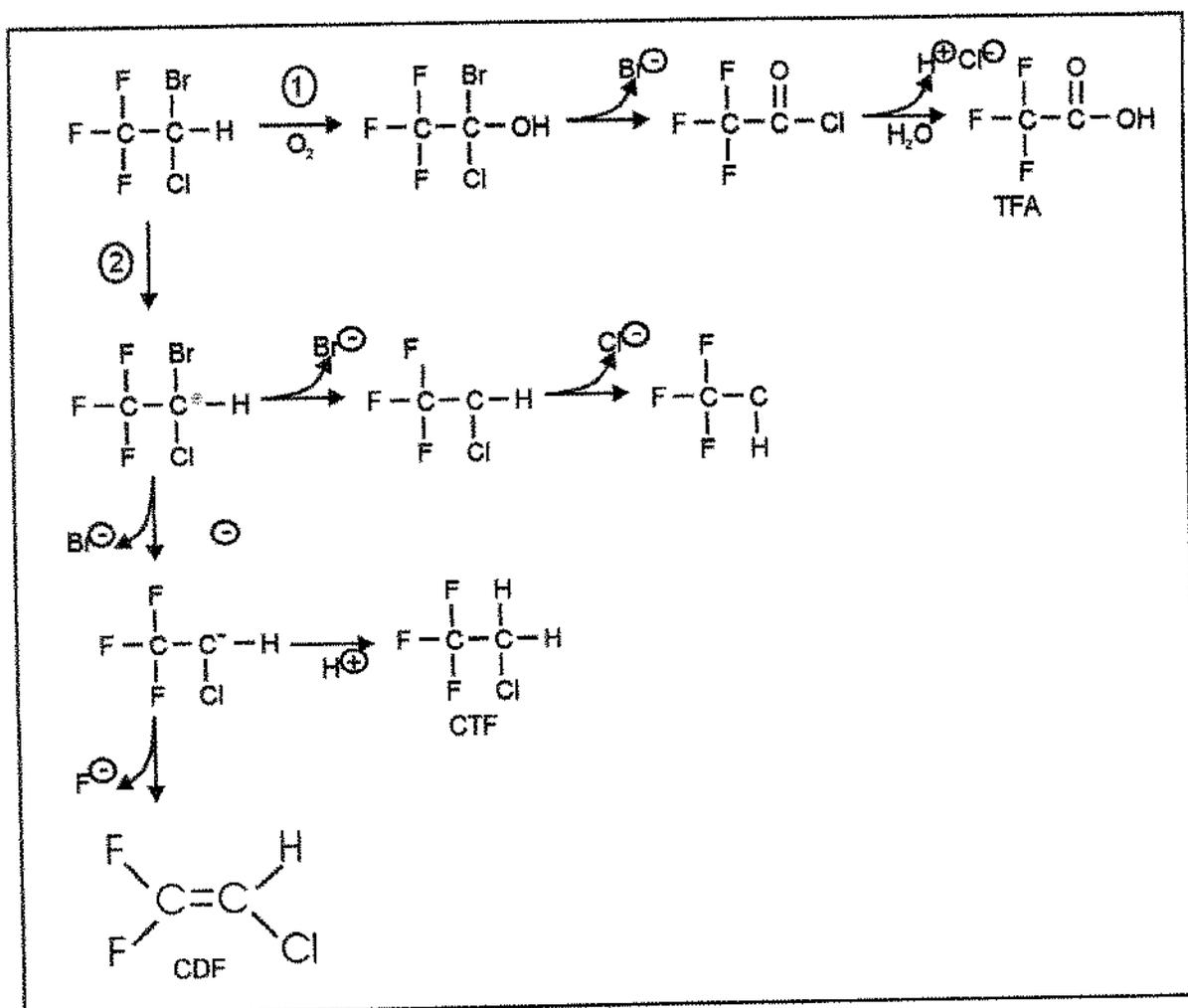


Figura II: Biotransformação do halotano. A via oxidativa e a via redutiva estão representadas pelos números 1 e 2, respectivamente. O ácido trifluoracético (TFA) é produzido pela biotransformação oxidativa, enquanto que íons flúor (F) resultam da biotransformação pela via redutiva. Íons brometo (Br) são produzidos por ambas as vias. Clorodifluoretano (CDF) e clorotrifluoretano (CTF) são metabólitos voláteis.

Tanto a via oxidativa como a redutiva podem metabolizar a droga, havendo uma clara diferença no metabolismo do halotano em condições aeróbicas e em condições anaeróbicas. O metabolismo oxidativo é favorecido quando os animais são expostos ao halotano em concentrações normais de O₂, sendo esta a via de metabolismo predominante em humanos durante anestésias. A concentração de O₂ é um fator crítico, pois lesões hepáticas ocorrem em animais expostos ao halotano na vigência de baixas concentrações de O₂. Em situações de hipoxia, há diminuição do metabolismo pela via oxidativa e significativo aumento do metabolismo pela via redutiva, resultando em compostos intermediários tóxicos que podem iniciar a lesão hepática produzida pelo halotano (COHEN, 1971; WIDGER, GANDOLFI, VAN DYKE, 1976; MCLAIN, *et al.*, 1979; JEE *et al.*, 1980; LIND *et al.*, 1985). O ácido trifluoracético é produto da biotransformação do halotano pela via oxidativa, enquanto que íons fluor resultam da biotransformação pela via redutiva. O íon brometo é produzido por ambas as vias, já o clorodifluoretileno e clorotrifluoretano são metabólitos voláteis (BENTLEY, 1992).

SHINGU, EGER II, JOHNSON (1982a) demonstraram que a hipoxia, por si só, mesmo na ausência de um agente anestésico, pode causar lesão hepática. Estes autores concluíram que a hipoxia tecidual hepática é a principal causa de lesão, quando comparada com o metabolismo da droga.

HUGHES, *et al.* (1980) estudaram o fluxo sanguíneo hepático em cães anestesiados com halotano e mantidos em ventilação controlada mecânica. Houve redução dos fluxos sanguíneos hepáticos arterial e venoso portal, o que, segundo STEFFEY (1996), pode causar importantes alterações na função hepática.

FEE *et al.* (1979), após repetidas anestésias com halotano em humanos, realizaram um estudo retrospectivo das enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT). Foi observado um aumento da atividade de ALT e GGT, sem aparecimento de icterícia clínica. ALLEN & DOWNING (1977) estudaram mulheres negras que receberam radioterapia para carcinoma uterino, e foram submetidas a uma, duas ou três anestésias com halotano, não encontrando alterações significativas dos valores de AST, FA e GGT.

Segundo BENJAMIN *et al.* (1985), o halotano pode produzir uma variedade de modelos de lesões hepáticas, tais como necrose multifocal, (semelhante a uma hepatite viral), necrose zonal confluyente submaciça ou até necrose maciça. A progressão da severidade da lesão está mais relacionada a exposições múltiplas ao halotano, do que à amplitude dos procedimentos cirúrgicos associados.

3.2. ISOFLURANO

O isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoretil difluormetil éter – CHF₂OCHClCF₃) foi sintetizado por Ross Terrell em 1965, sendo aprovado para uso clínico em 1980 (STOELTING, BLITT, COHEN, 1987). É um agente anestésico que possui baixa solubilidade e promove indução e recuperação rápidas. A estabilidade química do isoflurano é tão grande que, após anestesia clínica, 95% da quantidade administrada é exalada (FISEROVA-BERGEROVA, 1984). A fórmula estrutural deste composto está ilustrada na Figura III.

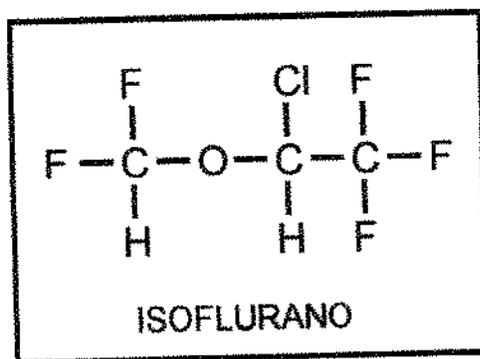


Figura III: Fórmula estrutural do isoflurano.

O isoflurano possui um grau de biotransformação de apenas 0,2 %, muito menor que o do halotano, o que pode impedir ou reduzir a produção de haptenos o suficiente para prevenir a resposta imune (FRINK, 1995). As pequenas quantidades de flúor e de ácido

trifluoracético, geradas na degradação do isoflurano, são excretadas pela urina e insuficientes para causar lesão celular. A Figura IV ilustra a biotransformação do isoflurano.

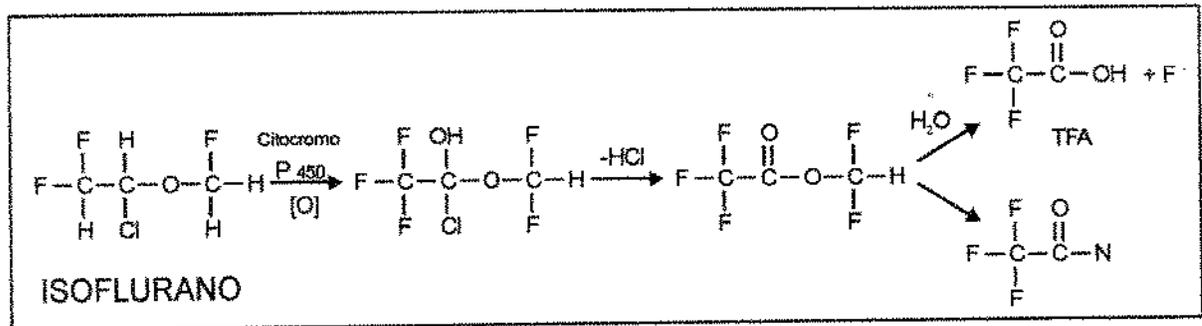


Figura IV: Biotransformação do isoflurano, com formação de ácido trifluoracético (TFA) e flúor (F).

O isoflurano tem sido amplamente utilizado, sendo raros os casos de hepatotoxicidade após a administração do mesmo (STOELTING *et al.*, 1987; ZIMMERMAN, 1991).

EGER II *et al.* (1987b) estudaram a toxicidade do isoflurano em ratos hipóxicos e observaram a ocorrência de lesão hepática leve em três dos quinze animais estudados. EGER II, JOHNSON, FERRELL (1987a) não encontraram lesão em fígado de ratos anestesiados com isoflurano, durante duas horas por dia, três vezes por semana, por duas semanas.

GELMAN *et al.* (1984a), comparando o isoflurano ao halotano, em cães, concluíram que o primeiro é o agente anestésico que mais mantém o suprimento de oxigênio aos tecidos e o que menos causa lesão hepática, mesmo quando administrado por um longo período.

GELMAN, FOWLER, SMITH (1984b); GELMAN *et al.* (1984c) e HURSH, GELMAN, BRADLEY (1987) observaram que o halotano diminui o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio hepático em maior extensão que o isoflurano, quando estas duas substâncias são utilizadas em doses equipotentes. FRINK *et al.* (1992a) observou que o isoflurano diminui o fluxo sanguíneo portal, mas mantém o fluxo arterial hepático.

Comparando-se os efeitos, em humanos da anestesia com halotano e com isoflurano, através de análise com microscopia eletrônica das células hepáticas, foi constatado que o halotano pode produzir alterações ultraestruturais que diferem quantitativa e qualitativamente das observadas com o isoflurano (GOLDFARB *et al.*, 1989).

Na classificação das drogas potencialmente hepatotóxicas, BORGES (1998) cita o halotano e o isoflurano como responsáveis por reações de natureza tóxico-alérgicas.

3.3. SEVOFLURANO

O sevoflurano [fluorometil 2,2,2-trifluoro-1-[trifluorometil] etil eter - $\text{CH}_2\text{FOCH}(\text{CF}_3)_2$], é um potente e um dos mais recentes anestésicos voláteis introduzido na prática clínica, que promove rápida indução e recuperação anestésicas devido à sua baixa solubilidade. A fórmula estrutural deste composto está ilustrada na Figura V.

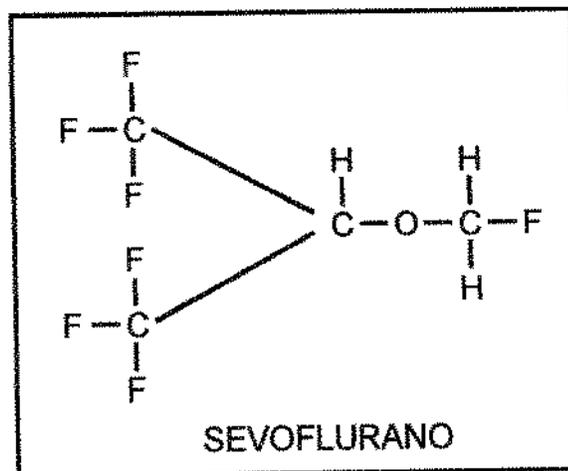


Figura V: Fórmula estrutural do sevoflurano.

O sevoflurano parece ter um baixo potencial para hepatotoxicidade. A biotransformação deste agente anestésico é de 3 a 5% e tem como metabólito o hexafluoroisopropanol que, baseado na reatividade química, tem baixa capacidade de ligação proteica, quando comparado ao o ácido trifluoracético. Este metabólito sofre biotransformação através da glicuronidação, formando o hexafluoroisopropanol-glicuronídeo, que é rapidamente excretado na urina (GREEN *et al.*, 1994; KHARASCH, 1995). A biotransformação do sevoflurano está demonstrada na Figura VI.

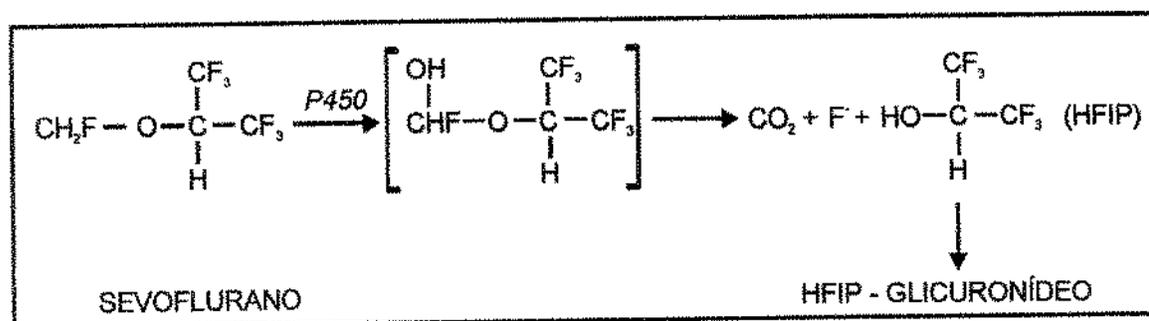


Figura VI: Biotransformação do sevoflurano.

STRUM *et al.* (1987) estudaram a toxicidade do sevoflurano em ratos e concluíram que, como outros anestésicos voláteis, ele pode produzir lesão hepática na vigência de hipoxia.

Recentes estudos em humanos voluntários mostraram não haver alterações dos níveis séricos de aminotransferases após anestesia com sevoflurano (HOLIDAY & SMITH, 1991; FRINK *et al.*, 1992a).

Este anestésico tem sido bastante estudado no que diz respeito à sua influência na perfusão hepática. CRAWFORD *et al.* (1992a, b) estudaram o fluxo sanguíneo hepático em ratos anestesiados com sevoflurano em ventilação espontânea, encontrando preservação do fluxo sanguíneo hepático total. Este mesmo efeito foi estudado por FRINK *et al.*

(1992b), que compararam este agente a outros anestésicos. Os resultados desta investigação mostraram que o sevoflurano e o isoflurano preservam o fluxo sanguíneo arterial hepático em grau significativamente maior que o halotano. Todos os anestésicos voláteis estudados reduziram o fluxo sanguíneo portal, sendo que o halotano produziu efeitos mais pronunciados. O sevoflurano manteve o fluxo sanguíneo e a oferta de oxigênio em concentrações menores que duas concentrações alveolares mínimas (CAM).

BERNARD *et al.* (1992) compararam os efeitos do sevoflurano e do isoflurano na circulação hepática de cães. Cada animal foi estudado durante anestesia com 1,2 CAM e 2 CAM de cada agente anestésico. A conclusão deste estudo é que ambos os anestésicos levaram a uma similar vasodilatação sistêmica e hepática.

3.4. PARACETAMOL

Os derivados do para-aminofenol foram introduzidos na prática clínica como agentes antipiréticos, no final do século XIX (1886). A acetanilida foi denominada “antifebrina”, devido à sua ação antipirética, sendo posteriormente descartada por ser excessivamente tóxica. Os primeiros relatos de envenenamento com tal droga inspiraram a pesquisa de compostos menos tóxicos. Vários derivados químicos do para-aminofenol foram testados. Um dos mais satisfatórios foi a acetofenacetina, introduzida na prática clínica em 1887. Foi amplamente utilizada em misturas analgésicas, até ser implicada como nefrotóxica (FLOWER, MONCADA, VANE, 1985).

O paracetamol, ou acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol), foi sintetizado em 1877 e utilizado pela primeira vez por von Mehring, em 1893. Entretanto, tornou-se popular somente após 1949, quando foi reconhecido como principal metabólito ativo de seus precursores, a acetanilida e a fenacetina (AMEER & GREENBLATT, 1977). Na Figura VII estão ilustradas as fórmulas estruturais da acetanilida, fenacetina e paracetamol.

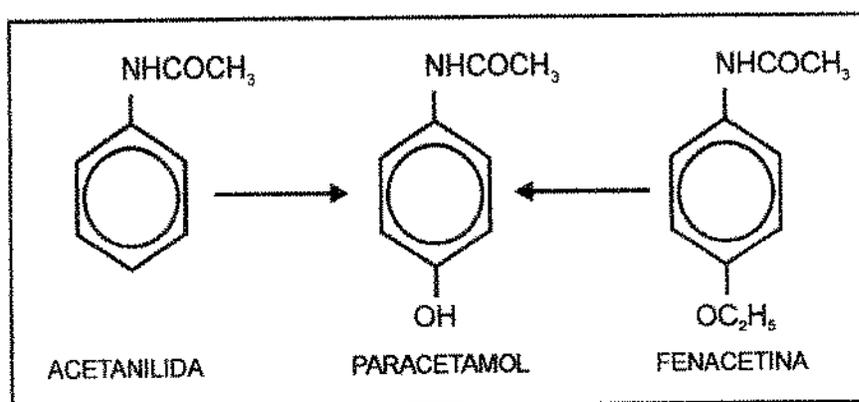


Figura VII: Fórmulas estruturais do paracetamol e seus precursores, acetanilida e fenacetina.

Analgesia e antipirese são as maiores ações terapêuticas do paracetamol, similares às da aspirina. O efeito antipirético deste composto parece ser resultado de uma ação direta sobre os centros hipotalâmicos de regulação da temperatura (DENSON & KATZ, 1994).

A potência antiinflamatória do paracetamol é fraca (BLACK, 1980). Ele é classificado como um agente antiinflamatório não-esteróide (INSEL, 1996) e seu mecanismo de ação parece estar relacionado à inibição central da síntese de prostaglandinas (AMEER & GREENBLATT, 1977).

O paracetamol é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, alcançando pico de concentração plasmática entre 30 e 60 minutos após ingestão de doses terapêuticas (MITCHELL, THORGEIRSON, POHER, 1974). Em ratos, doses de aproximadamente 110 a 305 mg/kg, por via oral, são consideradas farmacológicas (BENNETT, 1996).

Após ingestão, pequena parte do paracetamol é excretada pela urina, enquanto que a maior parte é removida da circulação pelo metabolismo hepático, após conjugação com o ácido glicurônico (em torno de 60 % da dose administrada) e com o sulfato (aproximadamente 35 % da dose administrada). O restante da droga é convertido pelo sistema de oxidases de função mista (citocromo P-450) em um metabólito potencialmente tóxico, o N-acetil-imidoquinona (N-acetil-p-benzoquinoneimine). A célula protege-se deste metabólito inativando-o, pela conjugação com a glutathiona hepática (Figura VIII). Este conjugado é, então, excretado pela bile e reabsorvido como conjugado acetaminofeno-

cisteína, após hidrólise dos resíduos glutamí e glicil no intestino. No rim, ocorre a N-acetilação parcial deste conjugado, formando o ácido mercaptúrico ou o conjugado N-acetilcisteína, sendo ambos excretados na urina (TOLEDO & BORGES, 1992; BENET, KROETZ, SHEINER, 1996).

Qualquer circunstância que aumente a proporção de paracetamol em relação à glutathiona pode levar à hepatotoxicidade. Assim, aumentando-se a quantidade de paracetamol ou diminuindo-se a de glutathiona disponível, eleva-se a predisposição à lesão hepática. Em indivíduos que utilizam altas doses da droga em tentativas de suicídio, os estoques de glutathiona são rapidamente depletados (RUMACK, 1986), aumentando a quantidade de metabólitos ativos disponíveis para causar necrose hepática (JOHNSON & TOLMAN, 1977).

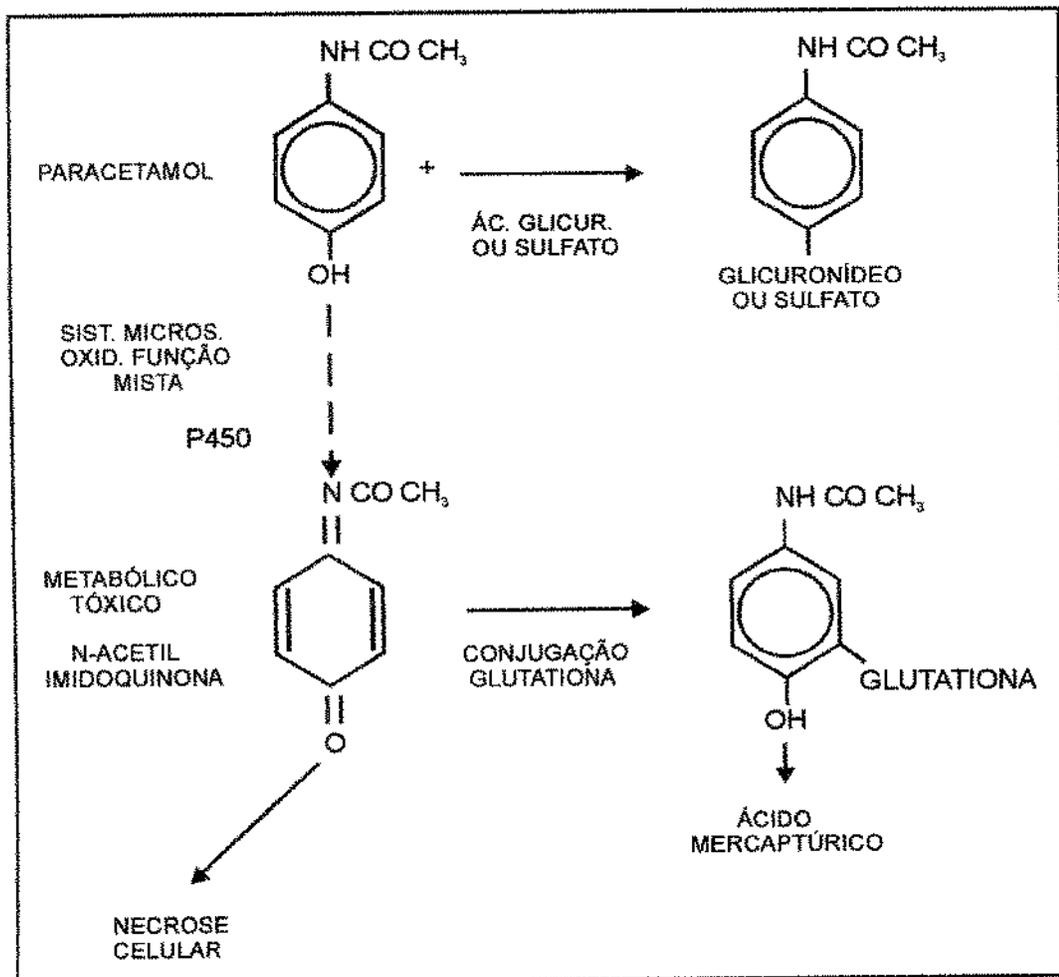


Figura VIII: Metabolismo do paracetamol.

Altas doses de paracetamol saturam os sistemas de conjugação (glicuronidação e sulfatação), fazendo com que ocorra aumento do metabolismo da droga pelo sistema de oxidases de função mista. Há depleção dos estoques de glutathione e os metabólitos tóxicos intermediários ficam livres para se ligarem covalente e irreversivelmente com macromoléculas (proteínas das membranas dos hepatócitos), causando a destruição das mesmas. Este parece ser o primeiro passo para o desenvolvimento de lesão hepática (JOLLOW *et al.*, 1973). Em humanos, a hepatotoxicidade é esperada quando são utilizadas doses superiores a 10 a 15 g/dia (PAYNE, THOMAS, RAJ, 1994). Drogas que causam indução enzimática aumentam o metabolismo do paracetamol por esta via (BARKER & CARLE, 1977).

A correlação entre elevação das aminotransferases e índice de lesão hepática após doses tóxicas de paracetamol (4 g/kg, via oral) foi estudada por DIXON *et al.* (1975). Os resultados desta investigação sugerem que o nível das enzimas, principalmente o da ALT, reflete a severidade da lesão hepática. KRAAN *et al.* (1990) verificaram que a administração de 200 mg/kg de paracetamol, duas vezes ao dia, por nove semanas, não causa aumento da atividade da ALT, concluindo que, nesta dose, a administração crônica da droga não causa lesão hepática.

JOLLOW *et al.* (1974) demonstraram que o rato é uma espécie resistente ao paracetamol, enquanto que hamsters e camundongos são mais suscetíveis a lesões hepáticas. Os ratos apresentaram lesão ocasional somente após doses de 1.200 mg/kg de peso (MITCHELL *et al.*, 1973). Em estudo realizado por TRUMPER, GIRARDI, ELIAS (1992), uma dose única de 500 mg/kg, via intraperitoneal, não causou lesão hepática. PRESCOTT *et al.* (1971) e POTTER *et al.* (1973) concluíram que altas doses de paracetamol causam necrose hepática dose-dependente em ratos.

DIXON, NIMMO, PRESCOTT (1971) estudaram o efeito hepático de doses tóxicas de paracetamol. Ratos mortos alguns dias após administração de 2,5 a 3,5 g/kg apresentaram necrose hepática e cirrose, enquanto que os mortos após administração diária de 0,5 a 1,1 g/kg, durante 100 dias, apresentaram congestão hepática, degeneração gordurosa e necrose difusa.

4. Materiais e Métodos

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Foram utilizados 94 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar, com idade variando entre 10 e 12 semanas, pesando de 260 a 290 gramas, nascidos e criados no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos com dieta livre, conforme rotina do serviço, e o estudo realizou-se sempre no mesmo horário.

Desta população, 38 ratos foram utilizados, aleatoriamente, para determinação dos valores de referência laboratoriais e respectivos intervalos de referência laboratoriais para as variáveis aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT) (MONTGOMERY, 1991). Também realizou-se estudo histológico hepático, para confirmação da integridade do fígado. Os demais ratos foram distribuídos nos sete grupos de estudo.

Os anestésicos voláteis (halotano, isoflurano e sevoflurano) foram administrados a, aproximadamente, uma concentração alveolar mínima (CAM) em oxigênio no rato (MAZZE, RICE, BADEN, 1985; CRAWFORD *et al.*, 1992a, b), com exposições diárias de 60 minutos (min), durante cinco dias consecutivos. O paracetamol foi administrado uma vez ao dia em dose única diária de 500 mg/kg de peso, via sonda orogástrica, por cinco dias consecutivos.

4.2. FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram distribuídos, aleatoriamente, 56 ratos em sete grupos de oito animais cada, como se segue:

- Grupo 1 (G1) : halotano 1,0 %
- Grupo 2 (G2) : isoflurano 1,5 %
- Grupo 3 (G3) : sevoflurano 2,5 %
- Grupo 4 (G4) : halotano 1,0 % e paracetamol 500 mg/kg
- Grupo 5 (G5) : isoflurano 1,5 % e paracetamol 500 mg/kg
- Grupo 6 (G6) : sevoflurano 2,5 % e paracetamol 500 mg/kg
- Grupo 7 (G7) : paracetamol 500 mg/kg

4.3. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Após pesagem diária em balança elétrica (Marte AS 500), cada grupo de ratos era colocado em um recipiente de vidro de 30x25x18 centímetros (cm), contendo um orifício de 1,2 cm na parte superior de um dos lados, para a entrada dos gases, e outro, de mesmo diâmetro, na parte inferior do outro lado, para a saída dos mesmos.

Os anestésicos foram vaporizados em oxigênio a 100%, usando-se 6 litros por minuto (l/min), em vaporizadores calibrados para halotano (Narcovap F 505 - Narcosul), isoflurano (HB 4.4) e sevoflurano (HB 4.3), testados previamente com analisador de gases (Datex Engstrom).

Nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano) e 3 (sevoflurano), após 60 min de anestesia inalatória com ventilação espontânea, os gases foram interrompidos e o recipiente aberto. Os animais ficaram respirando ar ambiente até acordarem.

Durante a anestesia inalatória, monitorizou-se a temperatura do recipiente através de um termômetro analítico e a temperatura corporal através do sensor retal de um teletermômetro (Yellow Spring), colocado todos os dias em um dos ratos, aleatoriamente. Caso ocorresse hipotermia, com temperatura retal $< 35,8$ °C (BIVIN, CRAWFORD, BREWER, 1979), o recipiente seria aquecido com uma lâmpada, colocada aproximadamente a 30 cm de distância do recipiente.

Nos grupos em que foram utilizados anestésico volátil e paracetamol (grupos 4, 5 e 6), procedeu-se da mesma maneira descrita anteriormente. Quando os ratos despertavam, o paracetamol era administrado a todos, aleatoriamente. A administração foi feita em diluição com 2 mililitros (ml) de água, de maneira que todos os ratos recebessem o mesmo volume de solução através de sonda gástrica (número 6, com 10 cm de comprimento), introduzida por via oral, segurando-se firmemente a pele do pescoço e dorso para manter a cabeça do animal imóvel (WAYNFORTH, 1980).

No grupo 7, o paracetamol foi administrado diariamente na mesma dose, conforme técnica descrita anteriormente.

4.4. COLETA DE MATERIAL

Para a coleta de material, no quinto dia após o final dos experimentos, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico a 2,5 %, na dose de 20 mg/kg de peso, através de punção em veia da cauda com cânula calibre 25, e mantidos em O₂ a 100% sob máscara. A anestesia venosa foi realizada 45 min após o término das experiências, para que a coleta pudesse ser feita, em todos os ratos, 15 min depois, isto é, exatamente 60 min após a realização dos experimentos.

Após anestesia, fixação em prancha apropriada e tricotomia abdominal, realizou-se laparotomia ampla. As vísceras foram afastadas, a aorta abdominal foi localizada e puncionada com cânula calibre 24. Foram coletados 3 ml de sangue em tubos de ensaio (Vacutainer - SST gel), os quais foram envoltos em papel alumínio e identificados. O fígado foi retirado e cortes transversais foram realizados nos lobos direito e esquerdo. Em seguida, foram colocados em frascos contendo formalina a 10 %, para fixação e, após cerca de aproximadamente 36 horas, fez-se a conservação dos mesmos em álcool 70%, até a inclusão em parafina e confecção das lâminas.

O sangue coletado foi centrifugado (Centrífuga FANEM – 204 N) a 2.500 rotações por minuto, durante 10 min. Separou-se o soro com pipeta e, após colocação em tubos de plástico protegidos da luz, estes foram encaminhados aos laboratórios em caixas de isopor com gelo.

A coleta de material dos 38 ratos, utilizados para a determinação dos valores de referência laboratoriais e para a análise histológica do fígado, obedeceu a mesma rotina já descrita.

No final das experiências, após a coleta de material, os ratos, ainda sob efeito da anestesia venosa com tiopental, foram sacrificados através de secção cardíaca.

4.5. PARÂMETROS AVALIADOS

4.5.1. Avaliação bioquímica do sangue

Através de equipamento automatizado (Mega - Merck) à 37°C, dosagens séricas de AST, ALT, FA e GGT foram determinadas, utilizando calibrador, controles normal e patológico e reagentes fornecidos pelo fabricante (Merck).

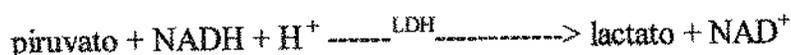
Os métodos de dosagem obedeceram aos seguintes princípios:

4.5.1.1. Aspartato aminotransferase (AST)



A diminuição da concentração de NADH é diretamente proporcional à atividade de AST presente na amostra.

4.5.1.2. Alanina aminotransferase (ALT)



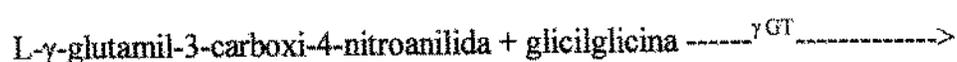
A velocidade de oxidação do NADH é diretamente proporcional à atividade da ALT presente na amostra.

4.5.1.3. Fosfatase alcalina (FA)



A alteração na absorvância, por unidade de tempo, é proporcional à razão da clivagem do substrato e também à atividade enzimática em tampão dietanolamina com pH 9,8.

4.5.1.4. Gama-glutamilttransferase (GGT)



A alteração da absorvância, por unidade de tempo, é proporcional à razão da quebra do substrato e da atividade enzimática.

4.5.2. Intervalos de Referência Laboratoriais (IRL)

Os valores de referência laboratoriais (VRL) são dados clínicos que definem os valores obtidos pela observação ou medida de um tipo particular de quantidade em uma referência individual. É convencional definir o IRL como o intervalo central de 95 % da curva de distribuição de uma determinada população, isto é, 2,5 % dos valores são cortados em ambas as extremidades. Portanto, os intervalos de referência laboratoriais são expressos como a média \pm duas vezes o desvio padrão ($\bar{X} \pm 2 \text{ DP}$). Os valores localizados entre os dois extremos (limites superior e inferior) constituem o IRL (SOLBERG, 1994).

Os intervalos de referência laboratoriais para as enzimas estudadas, foram criados a partir da análise enzimática dos 38 ratos utilizados, aleatoriamente, para obtenção dos VRL. Eles são, portanto, os parâmetros utilizados para a análise clínica dos resultados, não tendo expressão estatística.

4.5.3. Concentração plasmática de paracetamol (CPP)

A concentração plasmática de paracetamol foi determinada em equipamento automatizado (TDx FLx - Abbott), através da técnica de imunofluorescência polarizada. Para controle de qualidade foram analisadas, simultaneamente, amostras de soro adicionadas de paracetamol, fornecidas pelo fabricante (Abbott), cujos resultados estavam dentro dos limites permitidos.

4.5.4. Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP. A leitura das lâminas foi feita por um único patologista, em estudo cego.

Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina-eosina (HE).

Para análise histológica, observou-se a existência de alterações hepatocelulares, do tipo necrose e vacuolização citoplasmática, bem como a presença de congestão, reação inflamatória lobular e portal. O grau de acometimento hepático foi classificado como ausente (0), leve (+), moderado (+ +) ou intenso (+ + +), para cada parâmetro estudado.

Na avaliação de necrose, esta foi considerada de grau leve (+) quando focos isolados foram encontrados e de grau moderado (+ +) quando os focos de necrose eram maiores, porém localizados ao redor da veia centrolobular (VCL), isto é, zona 3 acinar. Caso ocorresse necrose mais extensa, com acometimento de zona 3, zona 2 (intermediária) e / ou zona 1 (periportal), o grau de acometimento seria considerado intenso (+++).

Menos de 40 % da área representada no corte histológico contendo vacuolização citoplasmática foi classificada como de grau leve (+); entre 50 e 80 % foi considerada de grau moderado (+ +). Quando praticamente toda a área representada no corte histológico apresentasse vacuolização, o grau de vacuolização seria considerado intenso (+ + +).

Considerou-se congestão de grau leve (+), quando localizada em VCL e grau moderado (+ +) quando localizada em VCL e áreas focais dos sinusóides hepáticos. Se a congestão ocorresse em VCL e nos sinusóides de toda a extensão do corte histológico, ela seria considerada de grau intenso (+ + +).

Considerou-se reação inflamatória lobular de grau leve (+), quando até 3 focos de infiltrado inflamatório foram encontrados na área representada no corte histológico e, de grau moderado, quando 4 a 6 focos foram encontrados. Caso fossem verificados mais de 7 focos, a reação inflamatória seria considerada de grau intenso (+ + +).

Para a reação inflamatória portal, a classificação baseou-se no grau de infiltrado inflamatório presente nos espaços porta.

4.6. DROGAS UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: paracetamol (Tylenol® - Cilag Farmacêutica Ltda.); tiopental sódico (Thionembital® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.); halotano (Halotano® - Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica S.A.); isoflurano (Forane® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) e sevoflurano (Sevorane® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.).

4.7. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), baseadas nos princípios éticos de experimentação animal.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise dos resultados foram empregados testes estatísticos, adotando-se o nível de significância de 5 % ($p = 0,05$) para as tomadas de decisões.

Para as variáveis peso e temperaturas, os resultados foram comparados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA), para determinação de significância

estatística entre os grupos. Caso ocorressem diferenças significativas, os grupos seriam identificados através do teste de Duncan.

Para as variáveis bioquímicas, os resultados foram comparados utilizando-se a ANOVA, a fim de detectar a existência de diferença estatística entre os animais estudados. Havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$), realizou-se o teste de Dunnett, para identificar quais grupos apresentavam resultados diferentes dos valores de referência laboratoriais (MONTGOMERY, 1991)

Posteriormente, empregou-se o teste t de Student para verificar a existência de diferenças estatísticas significativas entre os grupos em que houve administração de drogas, da seguinte maneira:

- Os grupos dos anestésicos voláteis foram comparados entre si:
 - G1 (halotano) vs G2 (isoflurano)
 - G1 (halotano) vs G3 (sevoflurano)
 - G2 (isoflurano) vs G3 (sevoflurano)

- Os grupos nos quais houve associação dos anestésicos voláteis com o paracetamol, foram comparados entre si:
 - G4 (halotano e paracetamol) vs G5 (isoflurano e paracetamol)
 - G4 (halotano e paracetamol) vs G6 (sevoflurano e paracetamol)
 - G5 (isoflurano e paracetamol) vs G6 (sevoflurano e paracetamol).

- Os grupos dos anestésicos voláteis foram comparados com o grupo do paracetamol:
 - G1 (halotano) vs G7 (paracetamol)
 - G2 (isoflurano) vs G7 (paracetamol)
 - G3 (sevoflurano) vs G7 (paracetamol)

➤ Cada grupo no qual foi utilizado anestésico volátil e paracetamol foi comparado aos grupos em que as respectivas drogas foram administradas isoladamente:

G4 (halotano e paracetamol) vs G7 (paracetamol)

G4 (halotano e paracetamol) vs G1 (halotano)

G5 (isoflurano e paracetamol) vs G7 (paracetamol)

G5 (isoflurano e paracetamol) vs G2 (isoflurano)

G6 (sevoflurano e paracetamol) vs G7 (paracetamol)

G6 (sevoflurano e paracetamol) vs G3 (sevoflurano)

Para a análise da concentração plasmática de paracetamol, a mesma seqüência de testes estatísticos (ANOVA, Dunnett e t de Student), descritos anteriormente, foi aplicada nos grupos G4, G5, G6 e G7.

Para a análise do estudo histológico, os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o teste de Wilcoxon para amostras independentes (CONOVER, 1971). Foram realizadas as mesmas comparações entre os pares de grupos, descritas anteriormente.

5. Resultados

5.1. VARIÁVEIS PESO E TEMPERATURAS

Os valores médios e respectivos desvios padrões referentes ao peso e às temperaturas, dos ratos e do recipiente, encontram-se nas Tabelas 1 e 2 (Anexos), respectivamente. Não houve diferença estatística significativa na análise destas variáveis.

5.2. VALORES DE REFERÊNCIA LABORATORIAIS

Os valores de referência laboratoriais individuais das variáveis AST, ALT, FA e GGT encontram-se na Tabela 3 (Anexos). As respectivas médias \pm uma e duas vezes o desvio padrão dos valores de referência laboratoriais e os intervalos de referência, encontram-se na Tabela 4 (Anexos).

5.3. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE

As Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Anexos) mostram os valores individuais das variáveis AST, ALT, FA e GGT, com as respectivas médias e desvios padrões, em G1 (halotano), G2 (isoflurano), G3 (sevoflurano), G4 (halotano e paracetamol), G5 (isoflurano e paracetamol), G6 (sevoflurano e paracetamol) e G7 (paracetamol), respectivamente. Nas Figuras IX, X, XI e XII, os valores individuais destas variáveis bioquímicas estão representados através de gráficos de dispersão. Os valores de p do teste t de Student, obtidos através de comparações entre as variáveis bioquímicas dos grupos estudados, encontram-se na Tabela 12 (Anexos).

5.3.1. Aspartato aminotransferase

A ANOVA mostrou um $p < 0,05$, indicando a existência de diferenças entre os grupos. Através do teste de Dunnett, aumentos significativos de AST foram detectados em

G1 (halotano), G2 (isoflurano), G4 (halotano e paracetamol), G5 (isoflurano e paracetamol) e G7 (paracetamol), quando comparados aos valores de referência laboratoriais.

Os resultados obtidos através do teste t de Student, mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), quando se comparou G2 (isoflurano) com G3 (sevoflurano); G2 (isoflurano) com G7 (paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol) e G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol) (Figura IX).

A análise clínica, feita através do intervalo de referência laboratorial, mostrou que todos os grupos estudados apresentaram valores aumentados de AST. O grupo que apresentou média mais alta desta enzima foi o G4 (halotano e paracetamol).

5.3.2. Alanina aminotransferase

A ANOVA mostrou um $p < 0,05$, indicando a existência de diferenças entre os grupos. Através do teste de Dunnett, detectaram-se aumentos significativos de ALT em G4 (halotano e paracetamol), G5 (isoflurano e paracetamol) e G7 (paracetamol), quando comparados aos valores de referência laboratoriais.

Os resultados obtidos pelo teste t de Student mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) quando se fez a comparação de G4 (halotano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol); de G5 (isoflurano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol); de G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol); de G4 (halotano e paracetamol) com G1 (halotano) e de G5 (isoflurano e paracetamol) com G2 (isoflurano) (Figura X).

A análise clínica, feita pelo intervalo de referência laboratorial, mostrou que todos os grupos estudados apresentaram valores aumentados de ALT. O grupo que apresentou média mais alta foi o G4 (halotano e paracetamol).

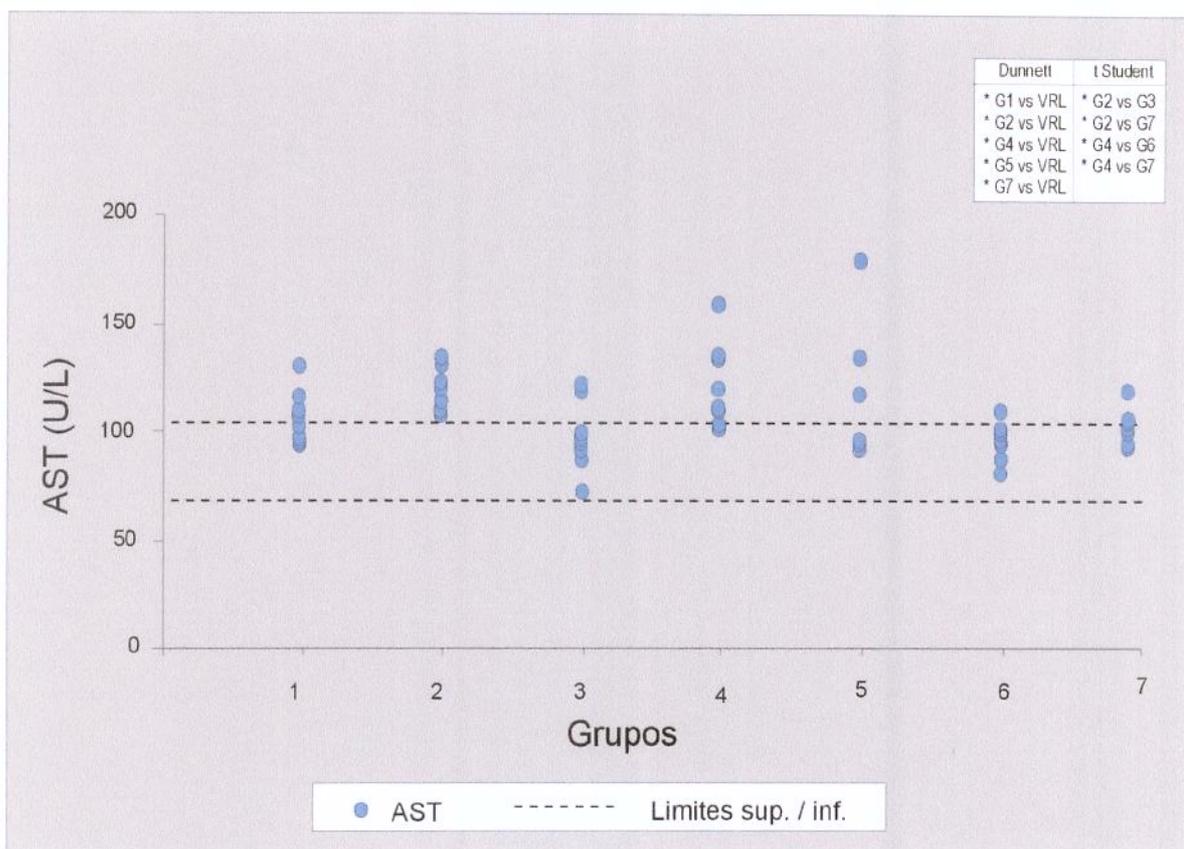


Figura IX: Representação gráfica da dispersão dos valores individuais de AST nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). As linhas tracejadas representam os limites superior e inferior do intervalo de referência laboratorial.

VRL = valores de referência laboratoriais.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (testes de Dunnett e t de Student).

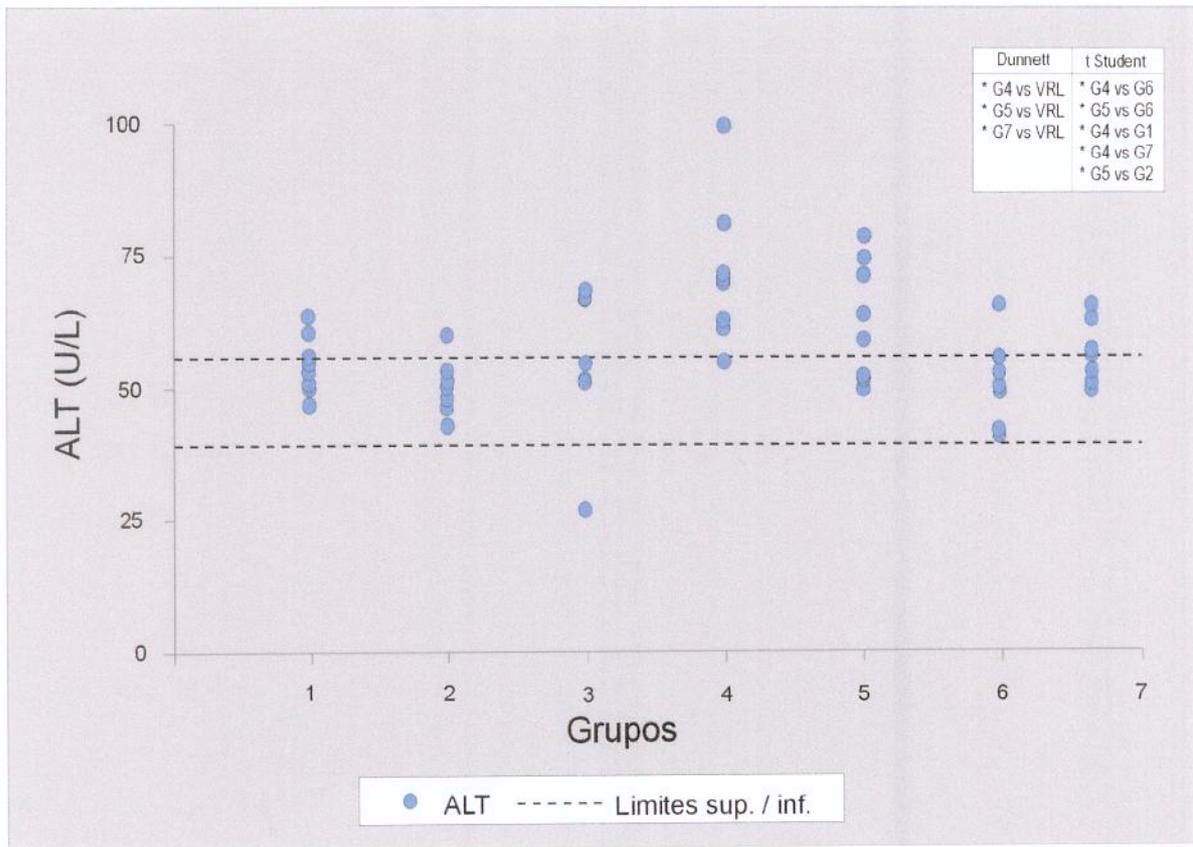


Figura X: Representação gráfica da dispersão dos valores individuais de ALT nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). As linhas tracejadas representam os limites superior e inferior do intervalo de referência laboratorial.

VRL = valores de referência laboratoriais.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (testes de Dunnnett e t de Student).

5.3.3. Fosfatase alcalina

Pela ANOVA, obteve-se um $p < 0,05$, indicando a existência de diferenças entre os grupos. O teste de Dunnett mostrou aumento significativo de FA em G2 (isoflurano), quando comparado aos valores de referência laboratoriais.

Os resultados obtidos pelo teste t de Student mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), quando foram comparados G2 (isoflurano) e G3 (sevoflurano); G1 (halotano) e G7 (paracetamol) e G2 (isoflurano) e G7 (paracetamol) (Figura XI).

A análise clínica, feita através do intervalo de referência laboratorial, mostrou que, com exceção dos grupos do sevoflurano (G3) e do paracetamol (G7), todos os outros apresentaram valores aumentados de FA.

5.3.4. Gama-glutamyltransferase

A ANOVA apresentou um $p < 0,05$, indicando a existência de diferenças entre os grupos. Através do teste de Dunnett, aumentos significativos de GGT foram detectados em G1 (halotano), G2 (isoflurano), G4 (halotano e paracetamol) e G5 (isoflurano e paracetamol), quando comparados aos valores de referência laboratorial.

Os resultados obtidos através do teste t de Student, mostraram diferenças estatísticas significativas, quando se comparou G1 (halotano) com G3 (sevoflurano); G2 (isoflurano) com G3 (sevoflurano); G1 (halotano) com G7 (paracetamol); G2 (isoflurano) com G7 (paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol); G5 (isoflurano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol) e G5 (isoflurano e paracetamol) com G7 (paracetamol) (Figura XII).

A análise clínica feita através do intervalo de referência laboratorial mostrou que a maioria dos valores individuais de GGT em G1 (halotano), G2 (isoflurano), G4 (halotano e paracetamol) e G5 (isoflurano e paracetamol), localizou-se no limite superior do IRL.

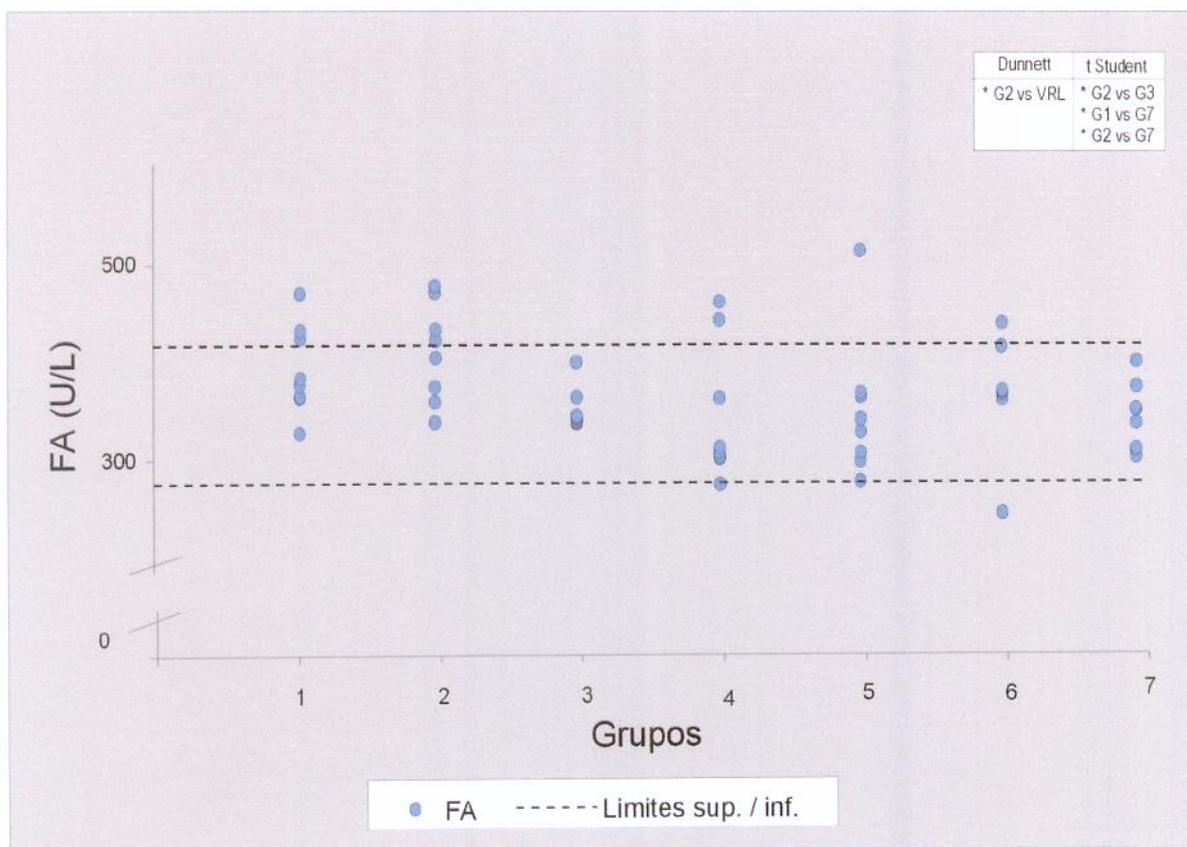


Figura XI: Representação gráfica da dispersão dos valores individuais de FA nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). As linhas tracejadas representam os limites superior e inferior do intervalo de referência laboratorial.

VRL = valores de referência laboratoriais.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (testes de Dunnett e t de Student).

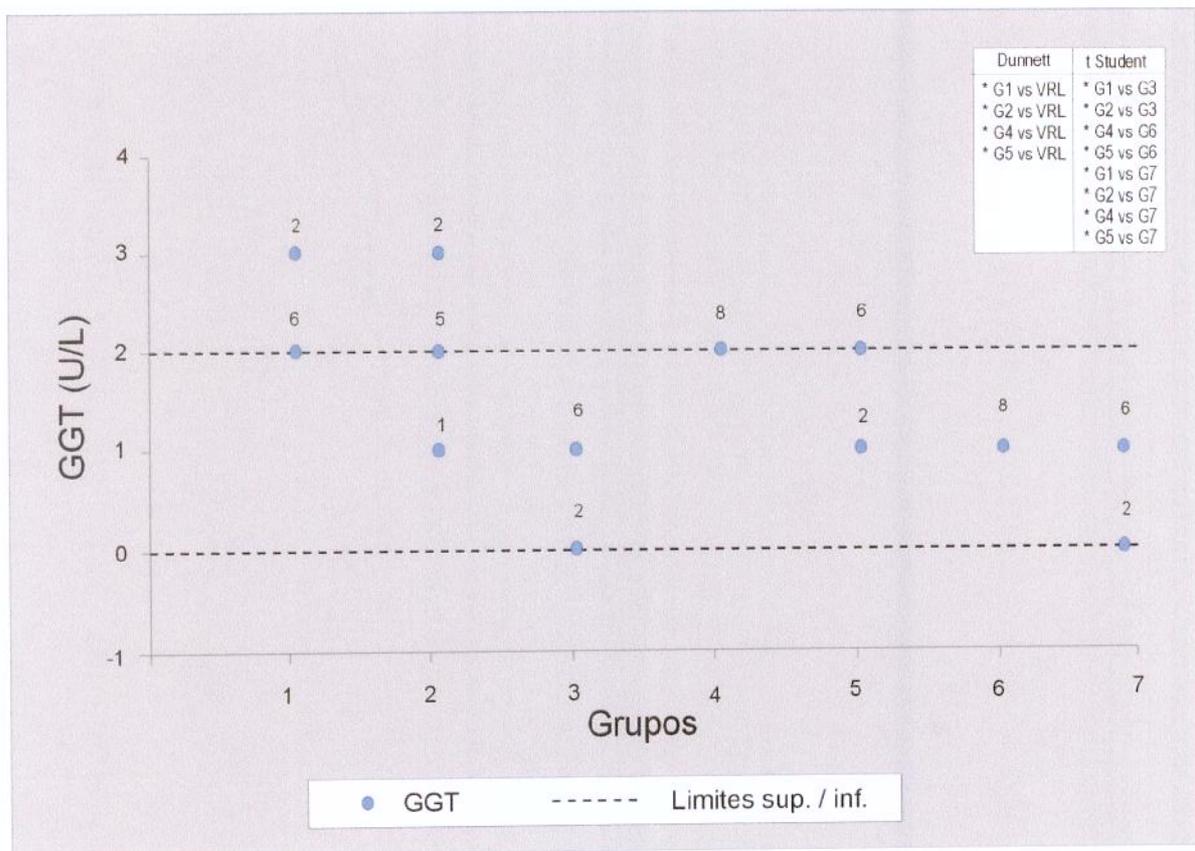


Figura XII: Representação gráfica da dispersão dos valores individuais de GGT nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). As linhas tracejadas representam os limites superior e inferior do intervalo de referência laboratorial. Os números colocados dentro do gráfico indicam a quantidade de animais que apresentou mesmo valor de GGT.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (testes de Dunnett e t de Student).

5.4. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PARACETAMOL

A Tabela 13 (Anexos) mostra os valores individuais das concentrações plasmáticas de paracetamol, suas respectivas médias e desvios padrões de G4 (halotano e paracetamol), G5 (isoflurano e paracetamol), G6 (sevoflurano e paracetamol) e G7 (paracetamol).

Para esta variável, a ANOVA apresentou um $p < 0,05$, indicando a existência de diferenças entre os grupos estudados. Através do teste de Dunnet, alterações significativas foram detectadas em G4 (halotano e paracetamol) e G5 (isoflurano e paracetamol), quando comparados com G7 (paracetamol). Os resultados obtidos através do teste t de Student mostraram diferença estatística significativa, quando se comparou G4 (halotano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol) ($p=0,002$) e G5 (isoflurano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol) ($p=0,003$) (Figura XIII). Não houve diferença estatística significativa quando se comparou G4 (halotano e paracetamol) com G5 (isoflurano e paracetamol) ($p=0,897$).

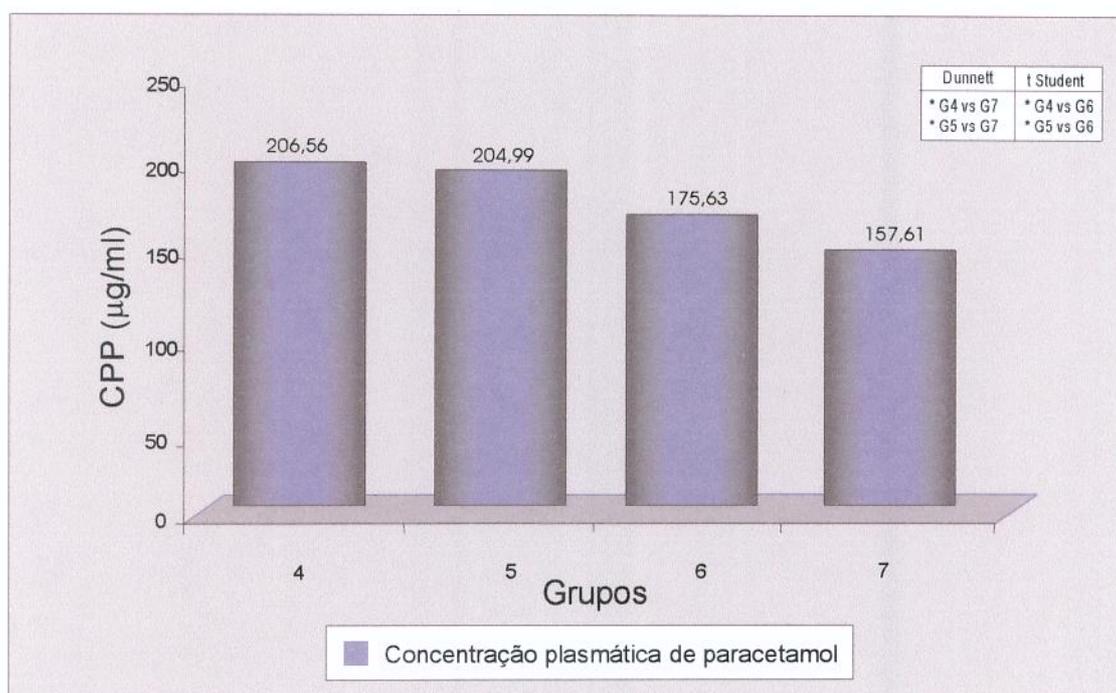


Figura XIII: Valores médios das concentrações plasmáticas de paracetamol (CPP) nos grupos 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol).

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (testes de Dunnett e t de Student).

5.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os 38 ratos utilizados para confirmação da integridade do fígado não apresentaram nenhum grau de necrose, vacuolização citoplasmática, congestão, reação inflamatória lobular e reação inflamatória portal.

As Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18 (Anexos) mostram o número de animais de cada grupo que apresentou determinado grau de necrose, vacuolização citoplasmática, congestão, reação inflamatória lobular e reação inflamatória portal, respectivamente. Também é mostrada a frequência, em porcentagem, destes graus de acometimento em cada grupo. Os

valores de p do teste de Wilcoxon, obtidos através de comparações entre variáveis histológicas dos grupos estudados, encontram-se na Tabela 19 (Anexos).

Com relação à necrose, os resultados obtidos com o teste de Wilcoxon mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), quando se comparou G1 (halotano) com G2 (isoflurano); G1 (halotano) com G3 (sevoflurano) e G1 (halotano) com G7 (paracetamol). Dos três anestésicos voláteis, o halotano foi o que apresentou maiores graus de necrose. As outras comparações realizadas não tiveram significância estatística (Figura XIV).

Quanto à vacuolização citoplasmática, os resultados do teste de Wilcoxon mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), quando se comparou G1 (halotano) com G7 (paracetamol); G2 (isoflurano) com G7 (paracetamol); G3 (sevoflurano) com G7 (paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol); G5 (isoflurano e paracetamol) com G7 (paracetamol) e G6 (sevoflurano e paracetamol) com G7 (paracetamol) (Figura XV). Quando utilizados isoladamente ou em associação, os anestésicos voláteis comportaram-se de maneira semelhante com relação à vacuolização citoplasmática. O único grupo que diferiu de todos os outros foi o G7, no qual o grau de acometimento foi estatisticamente menor que o dos outros grupos. A Figura XVI mostra um corte histológico de fígado apresentando vacuolização citoplasmática (animal do grupo 4).

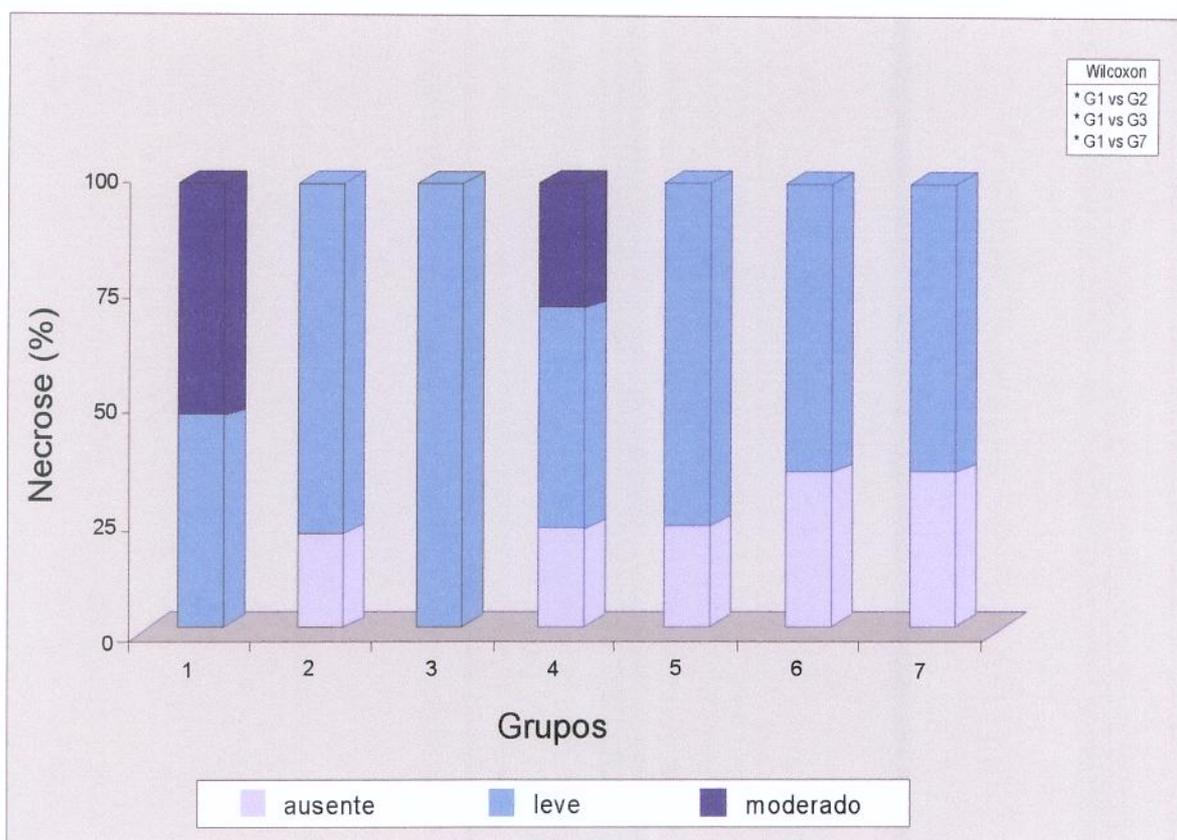


Figura XIV: Frequência (%) dos graus de necrose observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). O grau de acometimento intenso não está representado por não ter ocorrido.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (teste de Wilcoxon).

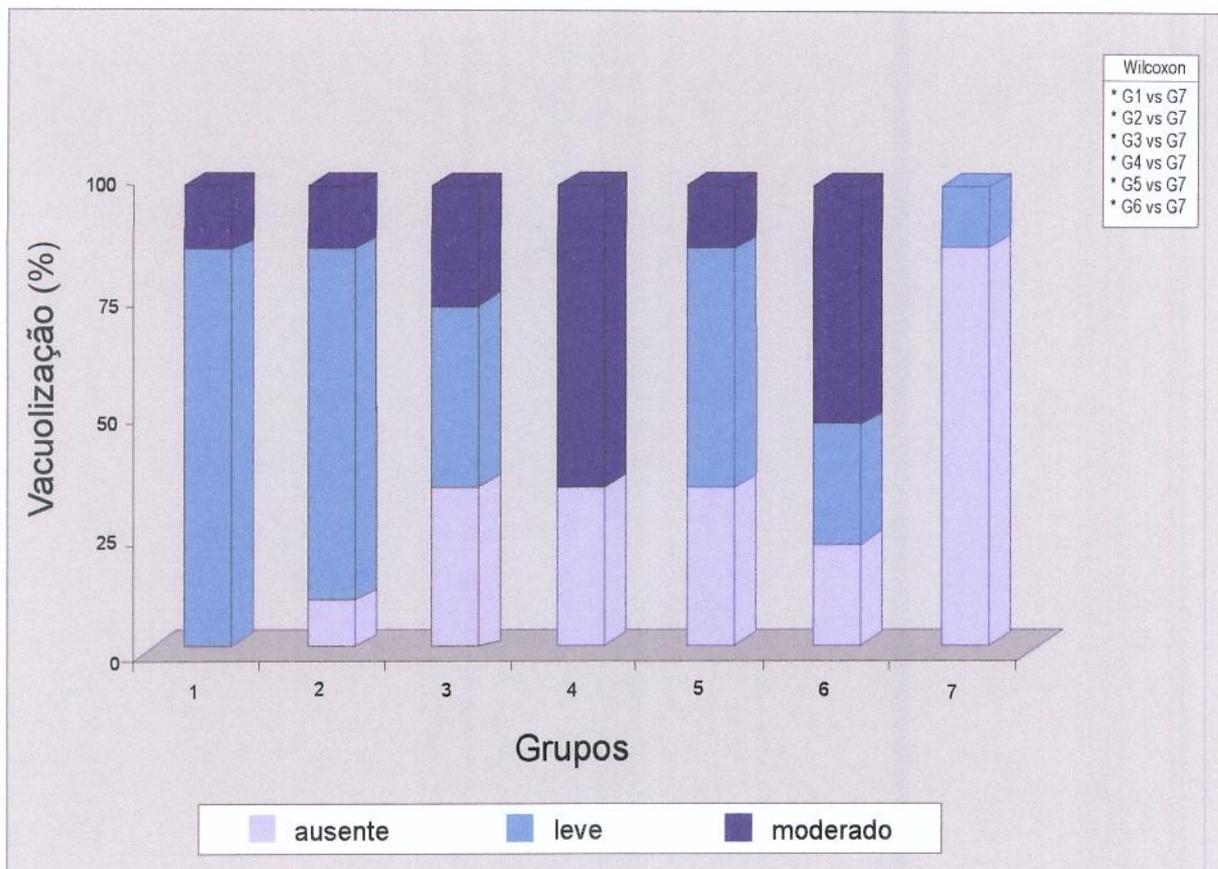


Figura XV: Frequência (%) dos graus de vacuolização citoplasmática observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). O grau de acometimento intenso não está representado por não ter ocorrido.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (teste de Wilcoxon).

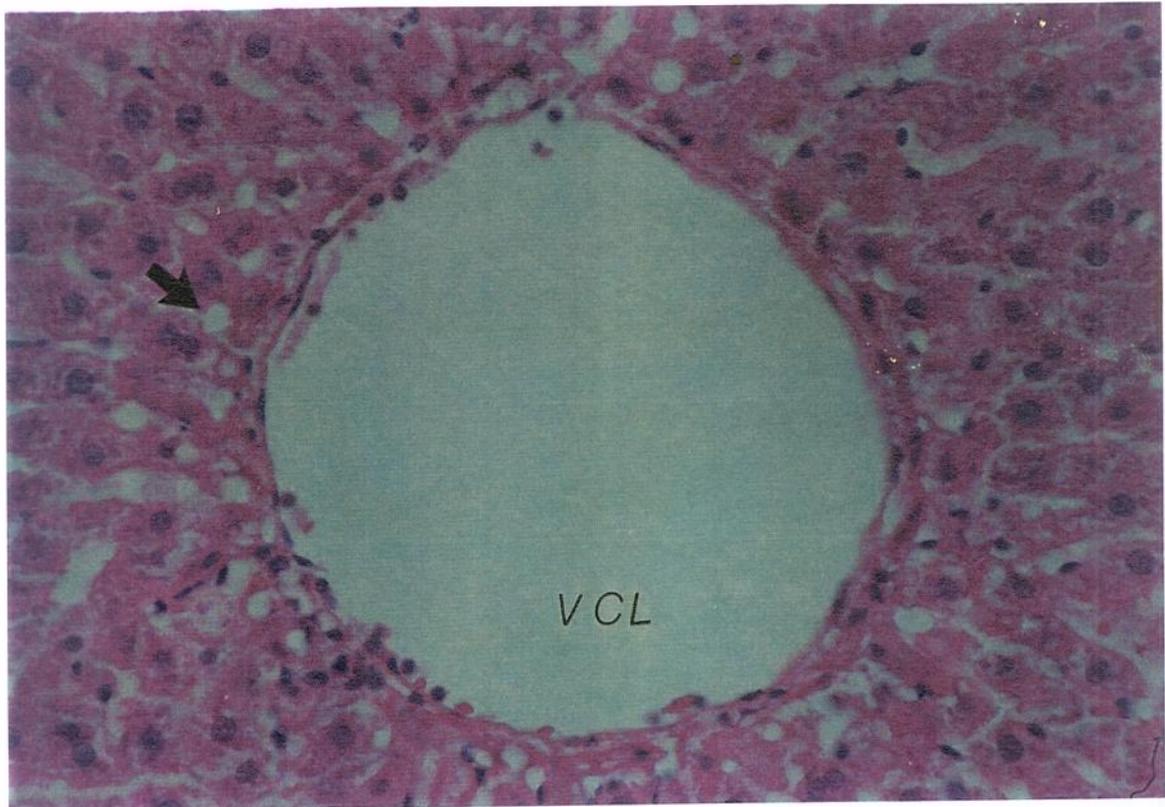


Figura XVI: Microscopia óptica de fragmento hepático de rato do grupo 4. A seta indica vacuolização citoplasmática em hepatócitos de zona 3 acinar (HE 400 x).

VCL = veia centrolobular.

No que se refere à congestão, os resultados obtidos com o teste de Wilcoxon mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), quando se comparou G1 (halotano) com G2 (isoflurano); G4 (halotano e paracetamol) com G1 (halotano); G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol); G5 (isoflurano e paracetamol) com G2 (isoflurano) e G6 (sevoflurano e paracetamol) com G3 (sevoflurano). Entre os anestésicos voláteis, o grupo do halotano foi o que apresentou maior porcentagem de animais com congestão. Todos os grupos em que o paracetamol foi utilizado apresentaram graus maiores e mais variados de congestão (Figura XVII). A Figura XVIII mostra um corte histológico de fígado apresentando congestão (animal do grupo 4).

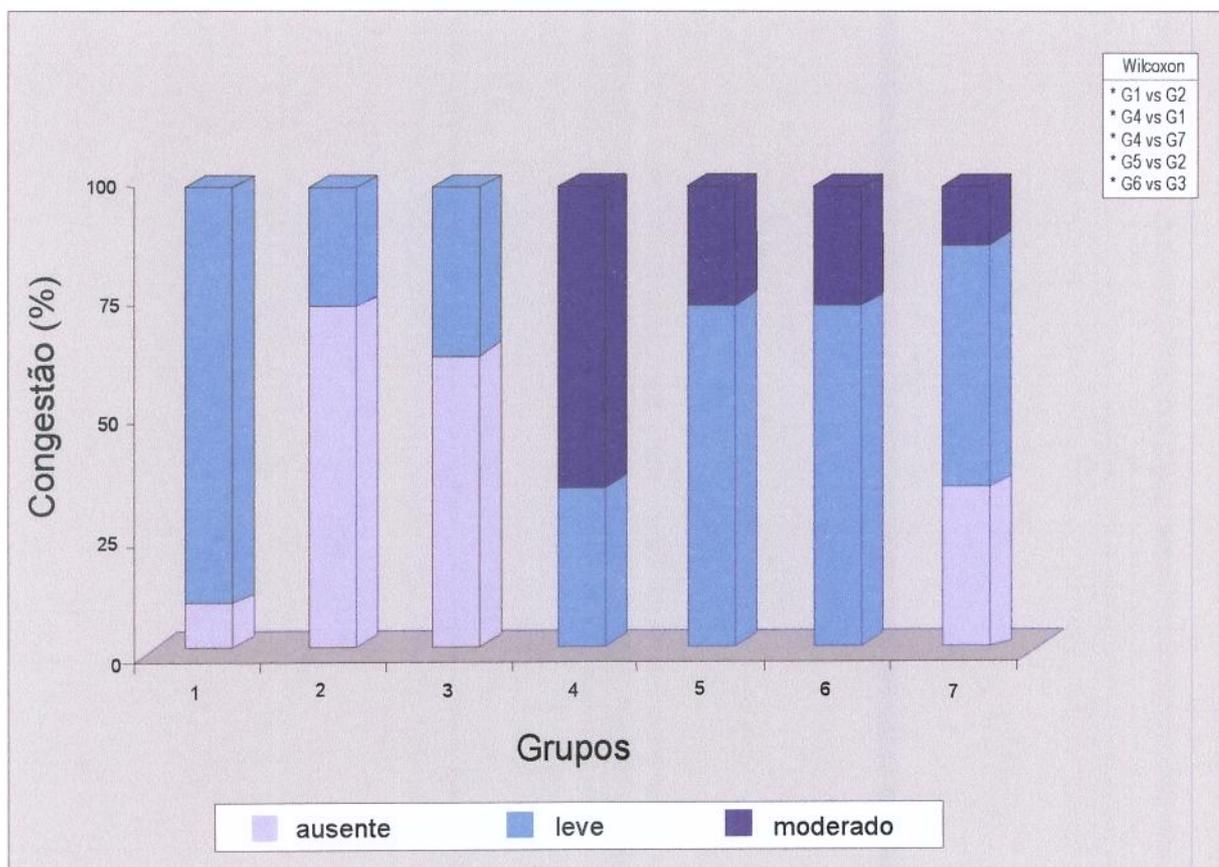


Figura XVII: Frequência (%) dos graus de congestão observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). O grau de acometimento intenso não está representado por não ter ocorrido.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (teste de Wilcoxon).

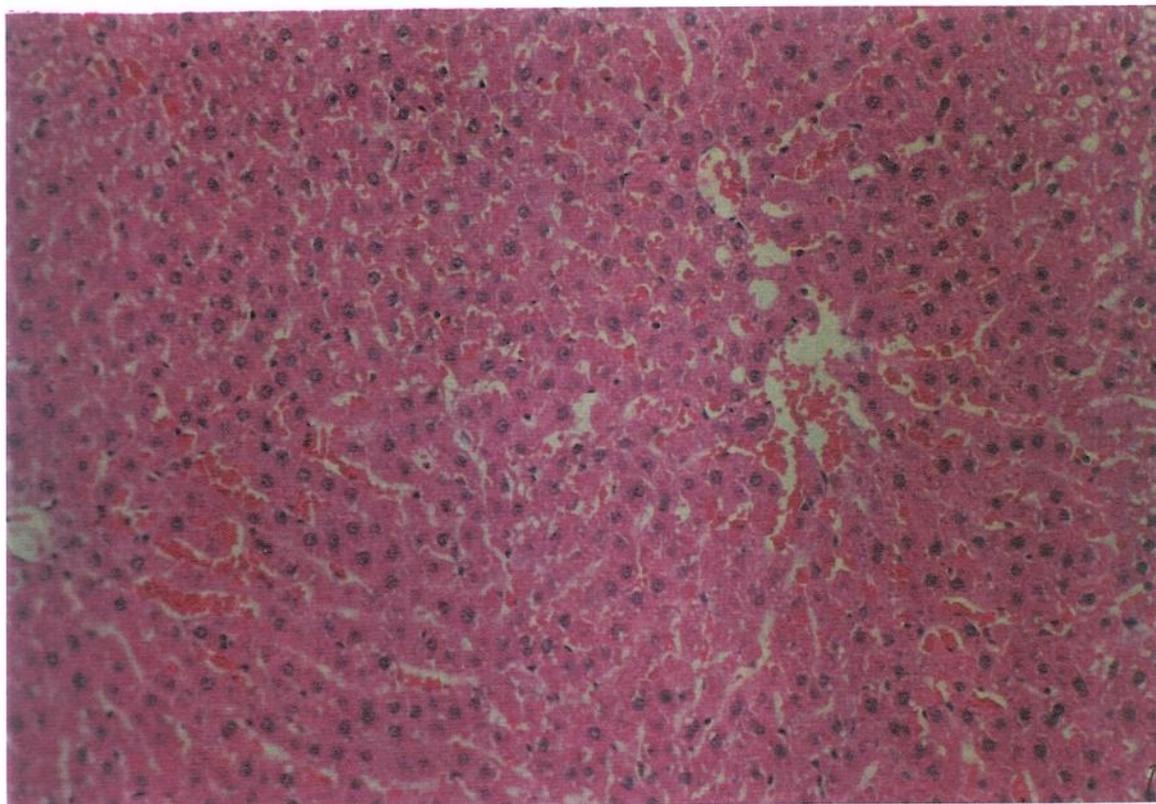


Figura XVIII: Microscopia óptica de fragmento hepático de rato do grupo 4, apresentando congestão sinusoidal e em VCL (HE 100 x).

VCL = veia centrolobular.

Quanto à reação inflamatória lobular, os resultados do teste de Wilcoxon mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), quando se comparou G4 (halotano e paracetamol) com G5 (isoflurano e paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G6 (sevoflurano e paracetamol); G4 (halotano e paracetamol) com G1 (halotano) e G4 (halotano e paracetamol) com G7 (paracetamol). Os grupos 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas entre si. O halotano (G1) apresentou diferença significativa apenas quando comparado ao paracetamol (G7) (Figura XIX). A Figura XX mostra um corte histológico de fígado, apresentando necrose e reação inflamatória lobular (animal do grupo 4).

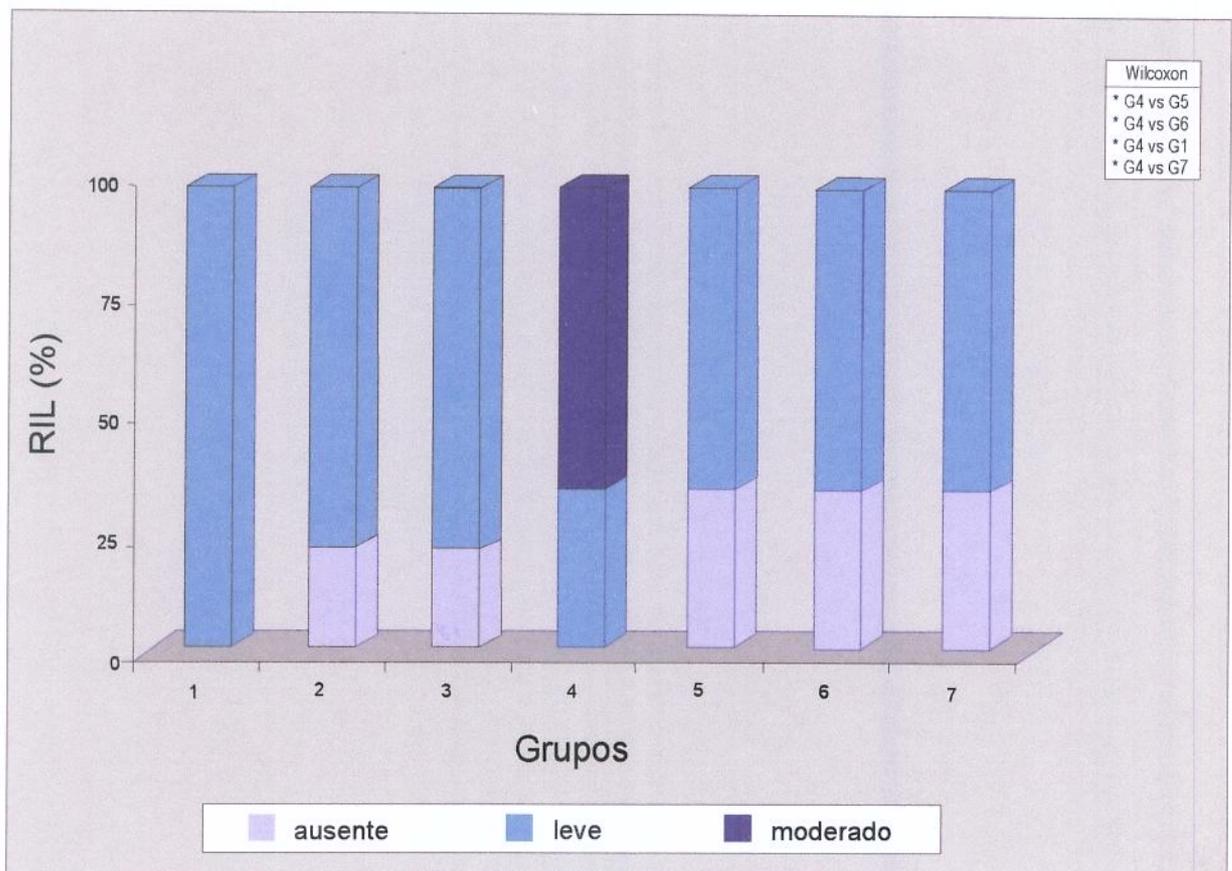


Figura XIX: Frequência (%) dos graus de reação inflamatória lobular (RIL) observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). O grau de acometimento intenso não está representado por não ter ocorrido.

* $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos descritos (teste de Wilcoxon).

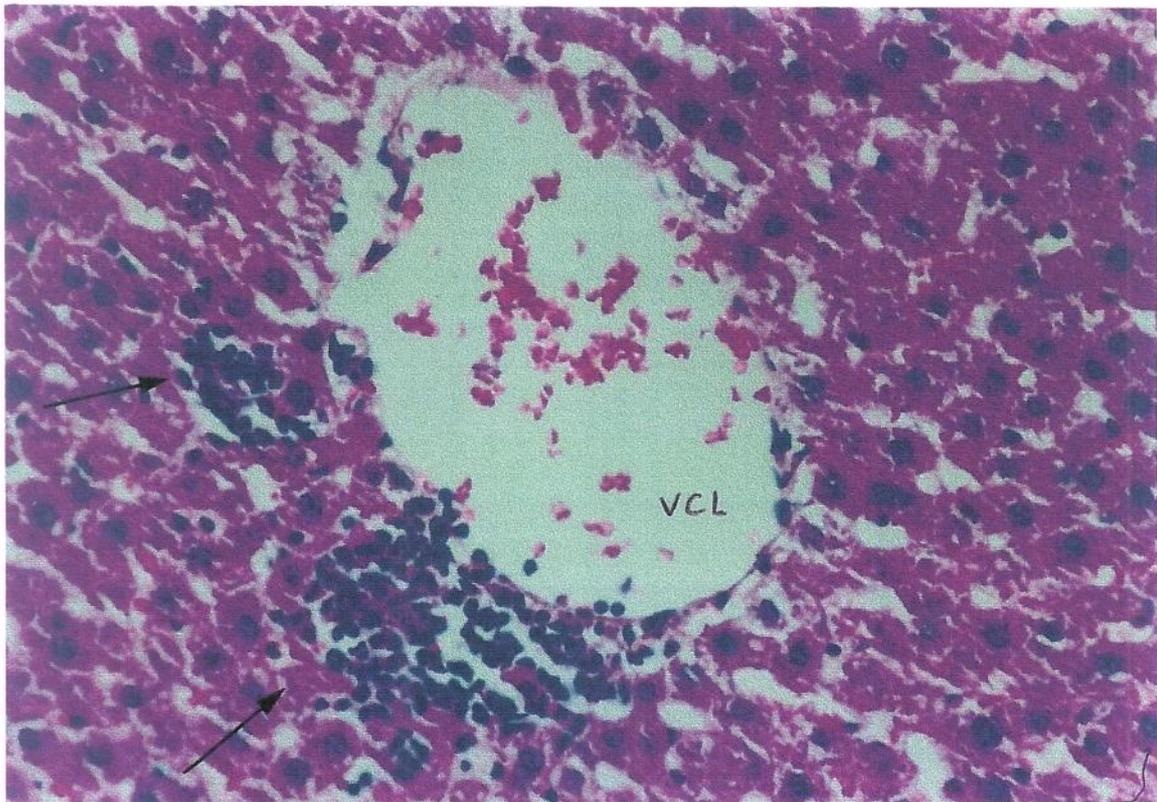


Figura XX: Microscopia óptica de fragmento hepático de rato do grupo 4. As setas indicam focos de necrose em zona 3 acinar com reação inflamatória no local (HE 400 x).
VCL = veia centrolobular.

Com relação à reação inflamatória portal, os resultados obtidos através do teste de Wilcoxon não mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estudados (Figura XXI).

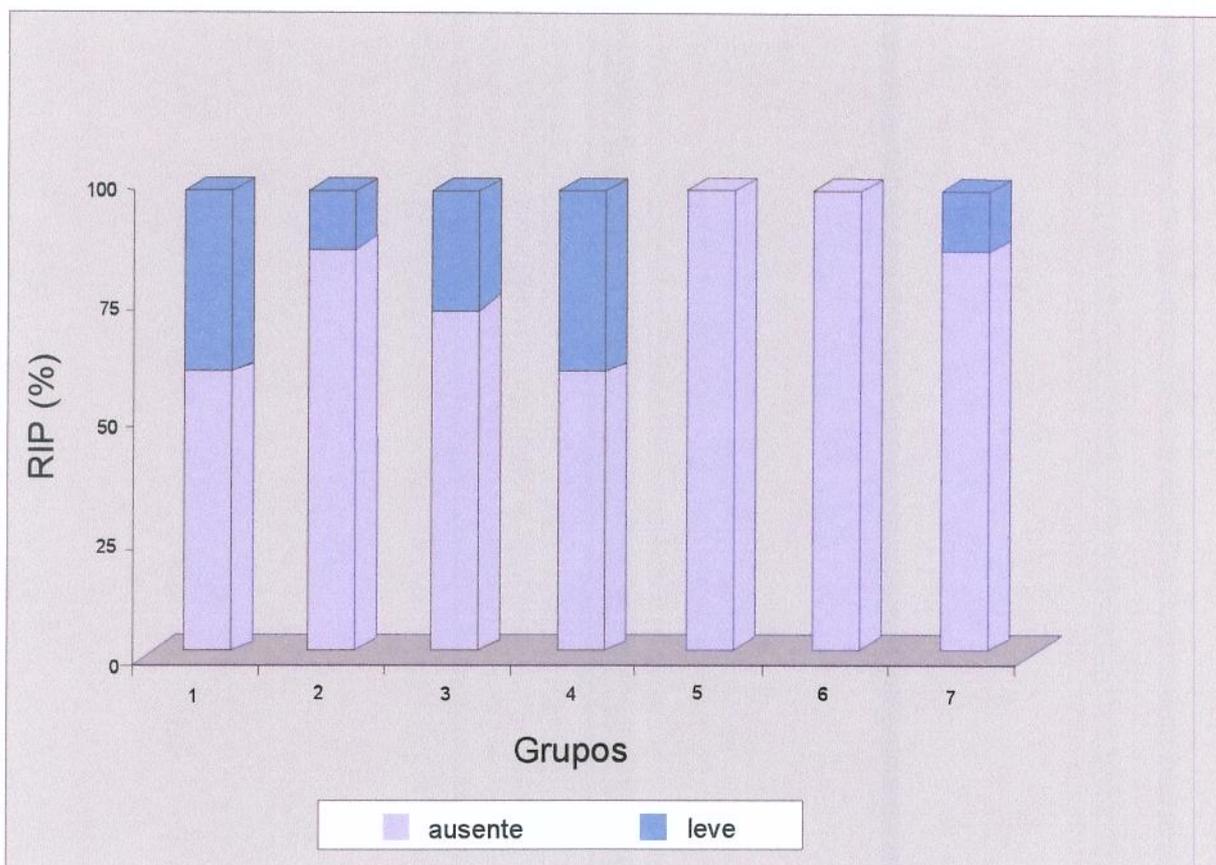


Figura XXI: Frequência (%) dos graus de reação inflamatória portal (RIP) observada nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). Os graus de acometimento moderado e intenso não estão representados por não terem ocorrido. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados (teste de Wilcoxon).

6. Discussão

Vários compostos causam alterações hepáticas através da biotransformação à metabólitos citotóxicos reativos, que podem ligar-se a proteínas hepáticas, enzimas e ácidos nucleicos, causando lesão celular, necrose e neoplasia. O fígado é o maior sítio de metabolismo de drogas, sendo particularmente vulnerável à toxicidade produzida por este mecanismo (MITCHELL & JOLLOW, 1975).

De acordo com PRESCOTT (1983), ZIMMERMAN & ISHAK (1994) e BORGES (1998), tanto o paracetamol quanto alguns hidrocarbonetos halogenados fazem parte de uma vasta lista de substâncias capazes de causar alterações hepáticas.

A maioria dos modelos animais de toxicidade hepática causada pelo halotano, anestésico inalatório mais estudado com relação à hepatotoxicidade, é baseada na estimulação da via redutiva do metabolismo desta droga. Um exemplo é o “modelo fenobarbital-hipoxia”, em que a biotransformação do halotano pela via redutiva está bastante aumentada, tanto pela indução enzimática quanto pela hipoxia (WIDGER *et al.*, 1976; MCLAIN *et al.*, 1979; JEE *et al.*, 1980; SHINGU, EGER II, JOHNSON, 1982a, b; VAN DYKE, 1982; PRESCOTT, 1983; EGER II *et al.*, 1987b; BROWN JR, 1988).

A maneira pela qual os anestésicos inalatórios causam toxicidade em animais e no homem tem sido extensamente investigada e vários dos mecanismos envolvidos foram definidos em nível celular e molecular (KENNA & JONES, 1995).

Os efeitos hepatotóxicos do paracetamol são dependentes da dose do medicamento ingerida; da taxa de absorção; da capacidade de glicuronidação e sulfatação; da atividade do citocromo P-450 e das reservas de glutathione. A intoxicação por esta droga é a causa mais importante de hepatite tóxica aguda na Inglaterra e Escócia, sendo também utilizada como tentativa de suicídio em outras partes do mundo (JAMES *et al.* 1975; TOLEDO & BORGES, 1992).

Neste estudo foram utilizados ratos adultos machos da linhagem Wistar, devido à disponibilidade destes animais pelo Biotério Central da UNICAMP, pelo fácil manuseio, pequeno porte e pela frequência com que são utilizados para esse tipo de experimento. Os animais não foram deixados em jejum antes do experimento, pois vários autores relatam

que o jejum aumenta a vulnerabilidade e a toxicidade hepática causada por algumas drogas (VAN DYKE, 1981; WHITCOMB & BLOCK, 1994). PESSAYRE *et al.* (1979) realizaram um trabalho comparando a hepatotoxicidade do paracetamol em ratos alimentados e em jejum. Os autores concluíram que o jejum pode diminuir a inativação de metabólitos quimicamente reativos pela glutatona, aumentar a ligação destes com proteínas hepáticas e aumentar a hepatotoxicidade de drogas biotransformadas em metabólitos químicos reativos, que são detoxificados pela glutatona.

Para a avaliação bioquímica do sangue, indispensável à presente pesquisa, foi necessário determinarem-se os valores de referência laboratoriais, para comparação com as variáveis que seriam analisadas e obtenção dos intervalos de referência laboratoriais, ou faixas de valores normais. Isto foi feito para que, além da interpretação estatística, fosse possível ter a interpretação clínica dos resultados. Há, na literatura, alguns valores de referência laboratoriais descritos, os quais poderiam ser usados na análise comparativa. No entanto, como existem muitos métodos de dosagem de AST, ALT, FA e GGT e muitas técnicas de coleta de material, o que pode interferir nos resultados (DIXON *et al.*, 1975; FEE *et al.*, 1979; MCILROY *et al.*, 1979; REICHLING & KAPLAN, 1988), optou-se por utilizar os valores de referência da amostragem significativa da população de ratos pertencentes ao estudo. Uma perfeita coleta de amostras é tão importante para a determinação da atividade das enzimas no soro quanto uma medição exata, feita por um aparelho de titulação. A execução inapropriada da coleta pode conduzir a resultados falsos (ADOLPH & LORENZ, 1981). A avaliação bioquímica do sangue, realizada através de equipamento automatizado, também pode variar, dependendo do equipamento e da temperatura utilizados para a realização dos exames (PISCINATO *et al.*, 1997).

O número de animais utilizados para obtenção dos valores e dos intervalos de referência laboratoriais baseou-se no número de animais necessário a um grupo controle (MONTGOMERY, 1991). Como os intervalos de referência laboratoriais são expressos como a média \pm duas vezes o desvio padrão, abrangendo, aproximadamente, 95% de uma população (SOLBERG, 1994), foi mais apropriado aumentar o número de animais analisados, uma vez que este aumento não compromete estatisticamente a relação número de grupos / tamanho do grupo controle .

No presente estudo, os anestésicos voláteis, halotano, isoflurano e sevoflurano, foram vaporizados em O₂ a 100%, para se evitar o risco da hepatotoxicidade pela hipoxia. Os anestésicos foram utilizados a, aproximadamente, uma concentração alveolar mínima no rato, de acordo com trabalhos de WAIZER, BAEZ, ORKIN (1973), WHITE, JOHNSTON, EGER II, (1974), MAZZE *et al.* (1985) e CRAWFORD *et al.* (1992a, b). Os animais foram expostos aos anestésicos 60 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos. Exposições múltiplas encontram-se entre os fatores que aumentam o risco de hepatotoxicidade (WRIGHT *et al.*, 1975; TROWELL *et al.*, 1975; ALLEN & DOWNING, 1977; NEUBERGER & WILLIAMS, 1984; BROWN JR & GANDOLFI, 1987).

A ventilação espontânea foi utilizada porque eram necessários cinco dias consecutivos para a realização dos experimentos, o que praticamente inviabilizaria a manutenção dos ratos intubados ou traqueostomizados durante este período. Também o risco de complicações associado a intubações repetidas poderia alterar os resultados. Além disso, a ventilação mecânica é considerada mais deletéria para o fluxo sanguíneo hepático que a ventilação espontânea (MAZE & PRAZER, 1990), pois o aumento da pressão intratorácica, produzido durante a ventilação com pressão positiva intermitente, causa diminuição do fluxo sanguíneo hepático e aumenta a resistência vascular esplâncnica total (AGUIAR, 1980; BROWN JR, 1988; CONZEN *et al.*, 1992).

Alguns autores afirmam que as alterações hemodinâmicas, que ocorrem durante a anestesia inalatória com ventilação espontânea, podem ser atribuídas aos efeitos farmacológicos diretos do anestésico, bem como ao aumento da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (P_aCO₂) (HUGHES, *et al.*, 1980; THOMSON *et al.*, 1983; BROWN JR, 1988; WOOD, 1990). Há evidências de que a hipercapnia aumente o fluxo sanguíneo hepático e que a hipocapnia seja um fator redutor desse fluxo, mais potente que a ação mecânica da hiperventilação pulmonar (BROWN, 1988). Segundo STEVENS & KINGSTONE (1996), a hipercapnia (P_aCO₂ até 95 mmHg) não altera a CAM dos anestésicos inalatórios.

CRAWFORD *et al.*, (1992b) realizaram estudo em ratos, para investigar as respostas hemodinâmicas e o fluxo sanguíneo para os diversos órgãos durante anestesia com halotano e sevoflurano, em ventilação espontânea. Foi observado um aumento similar

da P_aCO_2 nos dois grupos, mas o sevoflurano produziu mínimas alterações hemodinâmicas quando comparado ao halotano.

Segundo MCDONNELL (1996), a ocorrência de hipoxemia é rara quando se utiliza O_2 a 100% durante anestesia geral com ventilação espontânea, para procedimentos de curta duração (45 a 60 minutos). Num estudo feito por CRAWFORD *et al.* (1992b), utilizando halotano e sevoflurano em ventilação espontânea em ratos, foram mantidos níveis elevados de pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (P_aO_2 de, aproximadamente, 400 mmHg). O alto fluxo de O_2 (6 l/min) utilizado na presente pesquisa foi o mesmo usado por CRAWFORD *et al.* (1992b), onde a P_aCO_2 foi mantida em níveis bastante aceitáveis (aproximadamente 50 mmHg).

A temperatura dos ratos e do recipiente utilizado para a realização das anestésias foi monitorizada continuamente, pois o requerimento de anestésico sofre influências com a variação da temperatura. A hipotermia diminui a CAM de todos os anestésicos (VITEZ, WHITE, EGER II, 1974; STEVENS & KINGSTON, 1996). No presente estudo, não ocorreu hipotermia durante as anestésias e a variação das temperaturas entre os diversos grupos estudados não teve significado estatístico.

Ainda não está bem definida, na literatura, a dose de paracetamol capaz de causar efeitos hepatotóxicos em ratos. Apesar de ter-se utilizado, neste estudo, uma dose de 500 mg/kg de peso, considerada por BENNET (1996) como maior que a dose farmacológica preconizada (até 305 mg/kg), ela está aquém daquela considerada tóxica para estes animais, pois, segundo JOLLOW *et al.* (1974), o rato é uma espécie resistente aos efeitos tóxicos do paracetamol. Para TOLEDO & BORGES (1992), doses acima de 800 mg/kg são consideradas tóxicas. DIXON *et al.* (1971) obtiveram alterações hepáticas com doses acima de 2,5 g/kg, já MITCHELL *et al.* (1973) observaram lesões ocasionais somente após doses de 1.200 mg/kg. No entanto, a ingestão de altas doses de paracetamol aumenta a fração metabolizada pelo sistema microsomal hepático (citocromo P-450), aumentando, assim, o risco de hepatotoxicidade (TOLEDO & BORGES, 1992).

Para a análise bioquímica do sangue, as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase

alcalina (FA) foram dosadas, por serem consideradas índices de função hepática (McILROY *et al.*, 1979; MURRAY, ROWLANDS, TRINICK, 1992). As duas primeiras são estudadas mais comumente, sendo que a ALT é um indicador mais sensível e específico que a AST para diagnóstico de lesões celulares (DIXON *et al.*, 1975; FEE *et al.*, 1979; RINGLER & DABICH, 1979; REICHLING & KAPLAN, 1988). A concentração sérica de GGT pode estar aumentada em todas as formas de lesão hepática (REICHLING & KAPLAN, 1988), inclusive as induzidas por drogas (BROWN JR, 1988). A FA reflete tanto alteração celular hepática, como, principalmente, alterações conseqüentes a obstruções biliares (MCILROY, *et al.*, 1979; REICHLING & KAPLAN, 1988).

FEE *et al.* (1979) estudaram AST, ALT, FA e GGT após repetidas anestésias com halotano em humanos, tendo observado aumento da atividade de ALT e GGT. DIXON *et al.* (1975) estudaram os níveis séricos de aminotransferases após altas doses de paracetamol (4 g/kg) e verificaram um importante aumento de AST e ALT.

Os resultados da presente pesquisa, com relação aos efeitos produzidos nestas enzimas pelos anestésicos voláteis e pelo paracetamol, quando utilizados isoladamente ou em associação, foram analisados do ponto de vista clínico e estatístico.

A análise clínica dos resultados utilizou como parâmetros os intervalos de referência laboratoriais obtidos para cada enzima estudada. Os grupos cuja dispersão da maioria dos valores enzimáticos individuais localizou-se dentro do IRL, foram considerados normais do ponto de vista clínico. Sendo assim, tanto o halotano quanto o isoflurano, associados ou não ao paracetamol, aumentaram AST e elevaram GGT ao limite superior da faixa de normalidade. Aumento discreto de ALT foi observado no grupo em que o paracetamol foi utilizado isoladamente, enquanto que aumentos mais acentuados dessa enzima ocorreram nos grupos das associações de paracetamol aos anestésicos voláteis, halotano e isoflurano (G4 e G5). FA manteve-se dentro dos limites da normalidade.

A análise estatística dos resultados relacionados aos valores enzimáticos mostrou que o halotano e o isoflurano, associados ou não ao paracetamol, não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Quando comparado ao paracetamol (G7), o halotano (G1)

apresentou níveis mais elevados de FA e GGT, enquanto que o isoflurano (G2) apresentou níveis mais elevados de AST, FA e GGT. Não houve diferença significativa entre o sevoflurano (G3) e o paracetamol (G7).

Na comparação feita com os valores de referência laboratoriais, para identificar os grupos que apresentaram valores enzimáticos elevados, observou-se que o halotano, o isoflurano e o paracetamol (G1, G2 e G7) aumentaram AST e que as associações dessas três drogas aumentaram AST, ALT e GGT. O paracetamol (G7) também aumentou ALT. Portanto, os resultados clínicos foram coincidentes com os resultados estatísticos.

Como o objetivo deste trabalho é o estudo dos efeitos produzidos pelas associações dos anestésicos voláteis com o paracetamol e, nestas associações, ocorreram somente aumentos de AST, ALT e GGT, quando halotano e isoflurano foram associados àquela droga (G4 e G5), estes efeitos serão discutidos a seguir.

a- Efeitos da associação halotano e paracetamol sobre a AST:

Os grupos do halotano (G1) e do paracetamol (G7) não apresentaram diferença significativa nos valores de AST, quando comparados entre si. No entanto, quando comparados aos valores de referência laboratoriais, ambos aumentaram significativamente esta enzima. Quando se associou halotano e paracetamol (G4), o valor de AST aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, porém, observou-se diferença significativa desta associação apenas quanto ao paracetamol (G7). Estes resultados sugerem que o aumento da AST seja devido à associação de drogas, porém, com efeito marcante do halotano.

b- Efeitos da associação isoflurano e paracetamol sobre a AST:

Os grupos do isoflurano (G2) e do paracetamol (G7) apresentaram diferença significativa nos valores de AST, quando comparados entre si. No entanto, quando comparados aos valores de referência laboratoriais, ambos os grupos apresentaram aumento

significante desta enzima. Quando se associou isoflurano e paracetamol (G5), o valor de AST aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, mas não foi observada diferença significativa desta associação com isoflurano (G2) nem com paracetamol (G7). Estes resultados sugerem não ter havido efeito da associação de drogas e que o aumento da AST tenha ocorrido pelo efeito de somente uma delas. Como o aumento da AST produzido pelo isoflurano foi maior que o produzido pelo paracetamol, o anestésico volátil parece ter sido o responsável pelo aumento dos valores desta enzima.

c- Efeitos da associação halotano e paracetamol sobre ALT:

Os grupos do halotano (G1) e do paracetamol (G7) não apresentaram diferença significativa nos valores da ALT, quando comparados entre si. No entanto, quando comparados aos valores de referência laboratoriais, somente o paracetamol (G7) aumentou esta enzima. Quando se associou halotano e paracetamol (G4), o valor de ALT aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, sendo observada uma diferença significativa desta associação tanto com halotano (G1), quanto com paracetamol (G7). Estes resultados sugerem que o aumento da ALT seja devido à associação de ambas as drogas.

d- Efeitos da associação isoflurano e paracetamol sobre a ALT:

Os grupos do isoflurano (G3) e do paracetamol (G7) não apresentaram diferença significativa nos valores da ALT, quando comparados entre si. No entanto, quando comparados com os valores de referência laboratoriais, apenas o paracetamol (G7) apresentou aumento significativo desta enzima. Quando se associou isoflurano e paracetamol (G5), o valor de ALT aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, sendo observada uma diferença significativa desta associação apenas com o isoflurano (G2). Estes resultados sugerem que o aumento da ALT seja devido à associação de drogas, porém, com presença marcante dos efeitos produzidos pelo paracetamol.

e- Efeitos da associação halotano e paracetamol sobre a GGT:

Os grupos do halotano (G1) e do paracetamol (G7) apresentaram diferença significativa nos valores de GGT, quando comparados entre si. No entanto, quando comparado aos valores de referência laboratoriais, apenas o halotano (G1) apresentou aumento significativo de GGT. Quando se associou halotano e paracetamol (G4), o valor dessa enzima aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, sendo observada uma diferença significativa desta associação apenas com o paracetamol (G7). Estes resultados sugerem que o anestésico volátil tenha sido o responsável pelo aumento de GGT ocorrido na associação halotano e paracetamol (G4).

f- Efeitos da associação de isoflurano e paracetamol sobre a GGT:

Os grupos do isoflurano (G2) e do paracetamol (G7), apresentaram diferença significativa nos valores de GGT, quando comparados entre si. No entanto, quando comparado aos valores de referência laboratoriais, apenas o isoflurano (G2) apresentou aumento significativo desta enzima. Quando se associou isoflurano e paracetamol (G5), o valor de GGT aumentou significativamente em relação aos valores de referência laboratoriais, sendo observada uma diferença significativa desta associação apenas com o paracetamol (G7). Estes resultados sugerem que o anestésico volátil foi o responsável pelo aumento de GGT ocorrido na associação isoflurano e paracetamol (G5).

Com relação ao estudo histológico, pôde-se observar que os grupos do halotano, isoflurano e sevoflurano apresentaram diferentes graus de necrose, vacuolização citoplasmática, congestão e reação inflamatória lobular. A reação inflamatória portal foi mínima e sem significado estatístico. Comparados entre si, necrose e congestão foram mais acentuadas quando se utilizou halotano. Outras alterações ocorridas não tiveram significância estatística.

As alterações produzidas pelo paracetamol foram pequenas. Ocorreu leve grau de necrose e de reação inflamatória lobular, e a vacuolização citoplasmática foi menor que

nos outros grupos. Pequena porcentagem de animais apresentou grau moderado de congestão. A reação inflamatória portal foi mínima e sem significado estatístico.

As variáveis necrose e reação inflamatória portal não sofreram alteração quando se associou anestésicos voláteis e paracetamol, pois não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Nas associações dos três anestésicos voláteis com o paracetamol houve aumento da vacuolização citoplasmática, em relação ao uso isolado do paracetamol. O mesmo não ocorreu na comparação com o uso isolado de halotano, isoflurano e sevoflurano. Como este tipo de alteração histológica foi estatisticamente maior nos grupos em que os anestésicos voláteis foram utilizados isoladamente, em comparação com o uso isolado do paracetamol, supõe-se que os voláteis tenham sido os responsáveis pelos aumentos da vacuolização citoplasmática observados nas associações.

Na associação halotano e paracetamol, houve aumento significativo da congestão, em relação ao halotano e ao paracetamol isolados, porém, estes dois últimos grupos foram estatisticamente semelhantes entre si. Sugere-se, portanto, que o aumento da congestão neste grupo, deva-se à associação das drogas.

Nas associações isoflurano e paracetamol e sevoflurano e paracetamol houve aumento significativo da congestão, em relação ao isoflurano e ao sevoflurano isolados. Porém, o isoflurano e o sevoflurano foram estatisticamente semelhantes ao paracetamol. Supõe-se que o aumento da congestão seja devido às associações de isoflurano e sevoflurano com paracetamol, porém, com efeito pronunciado deste último.

A associação halotano e paracetamol produziu reação inflamatória lobular significativamente maior que halotano e paracetamol isolados, porém, estes não apresentaram diferenças significativas entre si. Portanto, é provável que este aumento da reação inflamatória lobular, deva-se à associação de halotano e paracetamol.

Tanto os anestésicos voláteis, como o paracetamol causaram um certo grau de necrose nos fragmentos hepáticos analisados. Os únicos grupos que apresentaram uma porcentagem de animais com grau moderado de necrose, foram aqueles em que o halotano

havia sido utilizado (G1 e G4). As alterações ocorreram ao redor da veia centrolobular, isto é, na zona 3 acinar, que corresponde, anatomicamente, à região central do lóbulo hepático. Necrose perivenular é um tipo de lesão característica de agentes que podem causar hepatotoxicidade através de reações idiossincrásicas, como o halotano e outros anestésicos voláteis, e de agentes com toxicidade intrínseca, como o paracetamol. A localização das lesões em zona 3, induzidas pelo paracetamol ou pelos anestésicos voláteis, parece refletir a concentração, nesta região, do sistema enzimático responsável pela conversão destes agentes em metabólitos hepatotóxicos (ZIMMERMAN & ISHAK, 1994).

A vacuolização citoplasmática, é um estado degenerativo do hepatócito que pode preceder a necrose (ZIMMERMAN & ISHAK, 1994). Embora seja um indicador de lesão não letal, é presságio de morte celular e, em muitas situações, encontra-se em células adjacentes às células necróticas (ROBBINS, 1991). No presente estudo ela foi observada exclusivamente ao redor da veia centrolobular, com maiores graus de acometimento em todos os grupos em que o anestésico volátil foi utilizado.

A congestão que, segundo ZIMMERMAN & ISHAK (1994), é uma das alterações histológicas hepáticas causadas pelo paracetamol, foi maior nos grupos em que esta droga foi utilizada isoladamente e em associação com os voláteis.

A reação inflamatória lobular geralmente acompanha a necrose hepatocelular (ZIMMERMAN & ISHAK, 1994). No presente estudo, ela foi do tipo linfomononuclear, estando presente em todos os grupos. O grau de acometimento mais acentuado ocorreu no grupo em que halotano e paracetamol foram associados.

Ainda segundo estes dois autores, a reação inflamatória portal é uma alteração presente nas hepatites crônicas. No presente estudo, como era esperado, ela foi mínima e sem qualquer significado estatístico.

Estes autores também afirmam que as manifestações bioquímicas geralmente refletem o padrão histológico da lesão. De maneira geral, as alterações histológicas e enzimáticas, ocorridas na presente pesquisa, foram discretas e esparsas, não sendo observados casos de lesões confluentes ou necrose hepática maciça. Tais casos ocorrem nos

modelos animais de hepatotoxicidade causada pelo halotano (BROWN JR, 1988), ou quando doses tóxicas de paracetamol são utilizadas, levando muitas vezes à falência hepática fulminante, em que o transplante de fígado é indicado (TOLEDO & BORGES, 1992).

O potencial hepatotóxico de certos halogenados é um fato incontestável. Há especulações de que reações hepáticas leves causadas pelo halotano possam comumente ocorrer durante a anestesia, no entanto, estas reações são efêmeras, não letais e sem significado clínico importante. O isoflurano parece apresentar potencial hepatotóxico muito menor que o do halotano. Apesar de existirem fortes indícios de que estas drogas possam realmente causar certos tipos de alterações, a incidência de reações hepáticas severas, causadas por estes agentes, é baixa (BROWN JR, 1988).

Os efeitos dos anestésicos voláteis na função metabólica têm sido estudados para apreciar suas relações com o "clearance" de drogas concomitantemente administradas. Segundo alguns autores, estes anestésicos inibem a biotransformação de drogas por efeitos diretos no citocromo P-450 e na glicuronidação, prejudicando o metabolismo de várias drogas (BROWN JR, 1971, 1972; GHONEIM, *et al.*, 1975; REILLY *et al.*, 1985; MAZE, 1990). FISEROVA-BERGEROVA (1984) demonstrou que alguns anestésicos voláteis podem inibir o metabolismo de outros anestésicos voláteis. Em seu estudo, o isoflurano alterou o metabolismo do halotano.

Segundo WOOD & WOOD (1984), os anestésicos voláteis podem influenciar a biodisponibilidade de drogas através de alterações na distribuição das mesmas, no fluxo sanguíneo hepático ou na capacidade hepática de metabolizá-las.

As respostas do sistema cardiovascular aos anestésicos voláteis incluem alterações hemodinâmicas, tais como vasodilatação, hipotensão arterial e diminuição do débito cardíaco, que podem modificar o fluxo sanguíneo para os diversos órgãos. CRAWFORD *et al.* (1992a, b) realizaram estudos em ratos anestesiados com halotano e sevoflurano em ventilação espontânea, tendo observado que o fluxo sanguíneo hepático total diminuiu somente com o halotano. Os ratos anestesiados com este agente anestésico

também apresentaram alterações hemodinâmicas, que se traduziram em diminuição do índice cardíaco e da pressão arterial sistêmica. O mesmo não ocorreu com o sevoflurano.

De acordo com GELMAN *et al.* (1984a), o isoflurano, assim como o halotano, diminui o fluxo sanguíneo portal, mas o fluxo sanguíneo hepático total é melhor mantido durante anestesia com este agente anestésico que com halotano. Estudos em diferentes modelos animais relatam que o isoflurano não provoca efeitos deletérios na circulação hepática (GELMAN *et al.*, 1984; HURSH *et al.*, 1987; BERNARD *et al.*, 1992). A disfunção hepática discreta associada ao isoflurano reflete, muito provavelmente, as alterações na liberação de O₂ hepático, resultando em oxigenação inadequada do hepatócito (STOELTING, 1997).

No presente estudo, utilizou-se paracetamol após anestesia com halotano, isoflurano e sevoflurano (G4, G5 e G6, respectivamente). A sua concentração plasmática foi dosada 60 minutos após a administração do mesmo, sendo comparada com a do grupo em que o paracetamol foi utilizado isoladamente (G7). Ocorreu aumento da concentração plasmática de paracetamol nos grupos em que ele foi utilizado após halotano ou isoflurano (G4 e G5). Estes dois grupos foram semelhantes entre si e significativamente diferentes de G6 (sevoflurano e paracetamol).

Os resultados obtidos com a presente pesquisa vão de encontro aos de WOOD & WOOD (1984), os quais demonstraram que o halotano e o isoflurano podem reduzir a eliminação de drogas no período pós-operatório. Estudo realizado por MURRAY *et al.* (1992) comprovou que a anestesia prolongada, tanto com halotano como com isoflurano, reduz o "clearance" de indocianina verde. AUNE *et al.* (1983) estudaram o efeito do halotano na cinética do paracetamol em hepatócitos isolados de ratos, demonstrando haver uma diminuição do metabolismo desta droga.

O paracetamol é uma droga cuja absorção depende do tempo de esvaziamento gástrico (GOLDFRANK *et al.*, 1990). Por essa razão, a associação com fármacos que prolongam esse esvaziamento pode retardar sua absorção e, conseqüentemente, seu pico de concentração plasmática (DENSON & KATZ, 1994). Em Anestesiologia, as únicas drogas

que, comprovadamente, retardam o esvaziamento gástrico são os opióides, que não foram utilizados em nosso estudo (MORGAN, 1984; NIMMO, 1984, 1989, 1990).

Durante exposição a um agente anestésico volátil, a manutenção da liberação de oxigênio hepático em relação à demanda é muito importante, pois a oxigenação hepatocítica inadequada pode ser o principal mecanismo responsável pela disfunção hepática, discreta e transitória, que freqüentemente acompanha a anestesia e a cirurgia. Qualquer anestésico que diminua a ventilação alveolar e/ou diminua o fluxo sanguíneo hepático pode interferir com a oxigenação do hepatócito, causando alterações na biodisponibilidade e no "clearance" hepático de drogas (WOOD & WOOD, 1984; STEVENS & KINGSTON, 1996; FRINK, 1995; STEFFEY, 1996; STOELTING, 1997).

O acometimento hepático, observado neste estudo, traduziu-se em alterações enzimáticas e histológicas discretas, ocorridas principalmente nos grupos em que halotano e isoflurano foram associados ao paracetamol. Nestes mesmos grupos também houve aumento da concentração plasmática de paracetamol. Apesar da associação de sevoflurano e paracetamol ter aumentado discretamente a concentração plasmática deste último, tal alteração não teve significado estatístico.

O sevoflurano promove menores alterações hemodinâmicas que os outros halogenados (EBERT, HARKIN, MUZI, 1995) e causa mínimas modificações no fluxo sanguíneo hepático (CRAWFORD *et al.*, 1992a, b). Estas podem ser as razões pelas quais este anestésico, quando utilizado isoladamente ou em associação com paracetamol, não produza alterações enzimáticas e histológicas significantes, nem modifique a concentração plasmática de paracetamol.

7. Conclusão

7.1. ASSOCIAÇÃO DE HALOTANO E PARACETAMOL:

Aumentou a aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase, não alterando a fosfatase alcalina. O aumento da gama-glutamilttransferase, observado neste grupo, foi devido ao efeito isolado do halotano, e não pela associação com o paracetamol.

Não aumentou a necrose, nem a reação inflamatória portal. O aumento da vacuolização citoplasmática observado foi devido ao efeito isolado do halotano, e não pela associação com o paracetamol. Aumentou a congestão, a reação inflamatória lobular e a concentração plasmática de paracetamol.

7.2. ASSOCIAÇÃO DE ISOFLURANO E PARACETAMOL:

Aumentou a alanina aminotransferase, não alterando a fosfatase alcalina. O aumento da aspartato aminotransferase e da gama-glutamilttransferase observado, foi devido ao efeito isolado do isoflurano, e não pela associação com o paracetamol.

Não aumentou a necrose, a reação inflamatória lobular e a reação inflamatória portal, mas aumentou a congestão. O aumento da vacuolização citoplasmática observado, foi devido ao efeito isolado do isoflurano, e não pela associação com o paracetamol.

Aumentou a concentração plasmática de paracetamol.

7.3. ASSOCIAÇÃO DE SEVOFLURANO E PARACETAMOL:

Não alterou as enzimas estudadas.

Não aumentou a necrose, a reação inflamatória lobular e a reação inflamatória portal, mas aumentou a congestão. O aumento da vacuolização citoplasmática observado, foi devido ao efeito isolado do sevoflurano, e não pela associação com o paracetamol.

Não alterou a concentração plasmática de paracetamol.

8. Summary

Large doses of paracetamol can cause hepatic toxic effects. Volatile anesthetics can also cause hepatotoxicity directly or through their metabolites.

In this study, we have tried to evaluate the effects of the association of volatile anesthetics, halothane, isoflurane and sevoflurane with paracetamol, in rats which were not submitted to hypoxia and remained with spontaneous ventilation.

Ninety four adult male Wistar rats, weighing 260 – 290 g, were used. Thirty eight of them were used to establish reference values and intervals. The rest was divided into seven groups with eight rats each one.

In groups one, two and three the rats were anesthetized one hour a day, for five consecutive days with one MAC (minimum alveolar concentration) of halothane, isoflurane and sevoflurane, respectively, vaporized in one hundred per cent oxygen.

In groups four, five and six, after one hour a day of anesthesia with halothane, isoflurane and sevoflurane (1 MAC), respectively, paracetamol (500 mg/Kg) was administered with a stomach tube, for five consecutive days.

In group seven, only paracetamol was administered (500 mg/kg) with a stomach tube for five consecutive days.

On the fifth day, after the normal daily treatment, the rats were anesthetized with thiopental sodium (20 mg/kg, intravenously). After laparotomy, three milliliters of blood were collected from the aorta, for enzymatic (aspartate aminotransferase - AST, alanine aminotransferase - ALT, alkaline phosphatase - AP and gamma-glutamyltransferase - GGT) and paracetamol plasmatic doses. Then, the histological study was done.

The clinical analyses of the results, showed the occurrence of isolated enzymatic alterations in all the groups, when the reference intervals were used as parameters. There was an increase in AST in groups one, two, four and five. In the same groups, GGT increased to the superior limit of the reference interval. ALT increased in groups four, five and seven, but AP did not alter. Statistically, the association of halothane and paracetamol increased the AST and ALT, but did not alter alkaline phosphatase. There was an increase

in GGT due to the effect of just halothane. There was no increase of necrosis and portal inflammatory reaction. The increase of vacuolation was due to the effect of just halothane. There was also an increase in the congestion, lobular inflammatory reaction and in the paracetamol plasmatic concentration.

The association of isoflurane and paracetamol increased ALT, but did not alter alkaline phosphatase. There was an increase in AST and in GGT due to the effect of only isoflurane. There was no increase of necrosis, lobular and portal inflammatory reactions. However, there was an increase of the vacuolation due to the effect of isoflurane. An increase of congestion and in the plasmatic concentration of paracetamol was observed.

The association of sevoflurane and paracetamol caused no alteration in any of the enzymes studied. Nor was there any increase in necrosis, lobular and portal reactions. The increase in vacuolation was due to the effects of only sevoflurane. There was an increase of the congestion, but the paracetamol plasmatic concentration did not alter.

9. Referências bibliográficas

- ADOLPH, L. & LORENZ, R., ed. – **Diagnóstico enzimático das doenças do coração, fígado e pâncreas.** 1 ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981. 125p.
- AGUIAR, E.A.O.G. – Função hepática e anestesia. **R. B. A., 30:** 67-80, 1980.
- ALLEN, P.J. & DOWNING, J.W. - A prospective study of hepatocellular function after repeated exposures to halothane or enflurane in women undergoing radium therapy for cervical cancer. **Br. J. Anaesth., 49:** 1035-1039, 1977.
- AMEER, B. & GREENBLATT, D.J. - Acetaminophen. **Ann. Intern. Med., 87:** 202-209, 1977.
- AUNE, H.; BESSENSSEN, A.; OLSEN, H.; MORLAND, J. – Acute effects of halothane and enflurane on drug metabolism and protein synthesis in isolated rat hepatocytes. **Acta Pharmacol. Toxicol., 53:** 363-368, 1983.
- BARKER, J.D. & CARLE, D.J. - Chronic excessive acetaminophen use in liver damage. **Ann. Intern. Med., 87:** 299-301, 1977.
- BENET, L.Z.; KROETZ, D.L.; SHEINER, L.B. - The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: GILMAN, A.G., ed. - **The pharmacological basis of therapeutics.** 9 ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.3-27.
- BENJAMIN, S.B.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G.; ZIMMERMAN, H.J.; IREY, N.S. - The morphologic spectrum of halothane induced hepatic injury: analysis of 77 cases. **Hepatology, 5:** 1163-1171, 1985.
- BENNETT, B.T. - Anesthesia of wild, exotic and laboratory animals. In: LUMB, W.V. & JONES, E.W., ed. - **Veterinary Anesthesia.** 3 ed. Illinois, Williams & Wilkins, 1996. p. 686-735.
- BENTLEY, J.B.; VAUGHAN, R.W.; GANDOLFI, A.J.; CORK, R.C. - Halothane biotransformation in obese and nonobese patients. **Anesthesiology, 57:** 94-97, 1982.

- BERNARD, J.M.; DOURSOUT, M.F.; WOUTERS, P.; HARTLEY, C.J.; MERIN, R.G.; CHELLY, J.E. – Effects of sevoflurane and isoflurane on hepatic circulation in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology*, 77: 541-545, 1992.
- BIVIN, S., CRAWFORD, M.P., BREWER, N.R. – Morphophysiology. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H., ed. - *The laboratory rat*. 1 ed. Orlando, Academic Press, 1979. p.74-103.
- BLACK, M. - Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 78: 382-392, 1980.
- BORGES, D.R. – Hepatopatia droga-induzida. *Diagnóstico & Tratamento*, 3: 31-35, 1998.
- BROWN JR, B.R. - The disphasic action of halothane on the oxidative metabolism of drug by the liver. An in vitro study in the rat. *Anesthesiology*, 35: 241-246, 1971.
- BROWN JR, B.R. - Effects of inhalation anesthetics on hepatic glucuronide conjugation. A study of the rat in vitro. *Anesthesiology*, 37: 483-488, 1972.
- BROWN JR, B.R., ed. - *Anesthesia in hepatic and biliary tract disease*. 1 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1988. 300p.
- BROWN JR, B.R. & GANDOLFI, A.J. - Adverse effects of volatile anesthetics. *Br. J. Anaesth.*, 59: 14, 1987.
- COHEN, E.N. - Metabolism of the volatile anesthetics. *Anesthesiology*, 35: 193-202, 1971.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA) – *Princípios Éticos na Experimentação Animal*. Boletim informativo São Paulo, 1991.
- CONOVER, W.J., ed. – *Practical nonparametric statistics*. 1 ed. New York, John Wiley & Sons, 1971. 462p.

- CRAWFORD, M.; LERMAN, J.; PILATO, M; ORREGO, H.; SALDIVIA, V.; CARMICHAEL, F. - Hemodynamic and organ blood responses to sevoflurane during spontaneous ventilation in the rat: a dose-response study. *Can. J. Anaesth.*, **39**: 270-276, 1992a.
- CRAWFORD, M.; LERMAN, J.; SALDIVIA, V.; CARMICHEL, F.J. - Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth. Analg.*, **75**: 1000-1006, 1992b.
- COLLINS, V.J. ed. - *Princípios de Anestesiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p.1039-1067.
- CONZEN, P.F.; VOLLMAR, B.; HABAZETTL, H.; FRINK, E.J.; PETER, K.; MESSMER, K.- Systemic and regional hemodynamics of isoflurane and sevoflurane in rat. *Anesth. Analg.*, **74**: 79-88, 1992.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L., ed. - *Patologia Estrutural e Funcional*. 1 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1991. 1231p.
- DENSON, D.D. & KATZ, J.A. - Agentes antiinflamatórios no esteroideos. In: RAJ, P.P., ed. - *Tratamiento práctico del dolor*. 2 ed. Atlanta, Mosby, 1994. p.598-649.
- DIXON, M.F.; NIMMO, J.; PRESCOTT, F. - Experimental paracetamol-induced hepatic necrosis: a histopathological study. *J. Pathol.*, **103**: 225-229, 1971.
- DIXON, M.F.; FULKER, M.J.; WALKER, B.E.; KELLEHER, J.; LOSOWSKY, M.S. - Serum transaminase levels after experimental paracetamol-induced hepatic necrosis. *Gut*, **16**: 800-807, 1975.
- EBERT, T.J.; HARKIN, C.P.; MUZI, M. - Cardiovascular responses to sevoflurane: a review. *Anesth. Analg.*, **81**: 11-22, 1995.
- EGER II, E.I.; JOHNSON, B.H.; FERRELL, L.D. - Comparison of the toxicity of I-653 and isoflurane in rats. A test of the effect of repeated anesthesia and use of dry soda lime. *Anesth. Analg.*, **66**: 1230-1233, 1987a.

- EGER II, E.I.; JOHNSON, B.H.; STRUM, D.P.; FERRELL, L.D. - Studies of the toxicity of I-653, halothane, and isoflurane in enzyme-induced, hypoxic rats. *Anesth. Analg.*, 66: 1227-1229, 1987b
- FEE, J.P.H.; BLACK, G.W.; DUNDEE, J.W.; McILROY, P.D.A.; JOHNSTON, H.M.L.; JOHNSTON, S.B.; BLACK, I.H.C.; MCNEILL, H.G.; NEILL, D.W.; DOGGART, J.R.; MERRET, J.D.; MCDONALD, J.R.; BRADLEY, D.S.G.; HAIRE, M.; MCMILLAN, S.A. - A prospective study of liver enzyme and other changes following repeat administration of halothane and enflurane. *Br. J. Anaesth.*, 51: 1133-1141, 1979.
- FISEROVA-BERGEROVA, V. - Inhibitory effect of isoflurane upon oxidative metabolism of halothane. *Anesth. Analg.*, 63: 399-404, 1984.
- FLOWER, R.J.; MONCADA, S.; VANE, J.R. - Substâncias antiinflamatórias e analgésicas-antipiréticas; drogas empregadas no tratamento da gota. In: GILMAN, A.G., ed. - *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. p.443-469.
- FRIIS, H. & ANDREASEN, P.B. - Drug-induced hepatic injury: an analysis of 110 cases reported to the Danish Committee on Adverse Drug Reactions between 1978 and 1987. *J. Intern. Med.*, 232: 133-138, 1992.
- FRINK JR, E.J. - The hepatic effects of sevoflurane. *Anesth. Analg.*, 81: 46-50, 1995.
- FRINK JR, E.J.; GHANTOUS, H.; MALAN, T.P. - Plasma inorganic fluoride with sevoflurane anesthesia: correlation with indices of hepatic and renal function. *Anesth. Analg.*, 74: 231-235, 1992a.
- FRINK JR, E.J.; MORGAN, S.E.; COETZEE, A.; CONZEN, P.F.; BROWN JR, B.R. - The effects of sevoflurane, halothane and isoflurane on hepatic blood flow in chronically instrumented greyhound dogs. *Anesthesiology*, 76: 85-90, 1992b.
- GALL, E.A. - Report of the Pathology Panel. National Halothane Study. *Anesthesiology*, 29: 233-249, 1968.

- GELMAN, S. - Anesthesia and the liver. In: BARASH, P.G., ed. - **Clinical Anesthesia**. 3 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1003-1023.
- GELMAN, S.; FOWLER, K.C.; SMITH, L.R. - Liver circulation and function during isoflurane and halothane anesthesia. **Anesthesiology**, **61**: 726-730, 1984a.
- GELMAN, S.; FOWLER, K.C.; SMITH, L.R. - Regional blood flow during isoflurane and halothane anesthesia. **Anesth. Analg.**, **63**: 557-565, 1984b.
- GELMAN, S.; RIMERMAN, V.; FOWLER, K.C.; BISHOP, S.P.; BRADLEY, E.L. - The effect of halothane, isoflurane and blood loss on hepatotoxicity and hepatic oxygen availability in phenobarbital-pretreated hypoxic rats. **Anesth. Analg.**, **63**: 965-972, 1984c.
- GHONEIM, M.M.; DELLE, M.; WILSON, W.R.; AMBRE, J.J. - Alteration of warfarin kinetics in man associated with exposure to an operating room environment. **Anesthesiology**, **43**: 333-336, 1975.
- GOLDFARB, G.; ROGIER, E.; GEBAUER, C.; LASSEN, C.; BERNUAU, D.; JOLIS, P.; FELDMANN, G. - Comparative effects of halothane and isoflurane anesthesia on the ultrastructure of human hepatic cells. **Anesth. Analg.**, **69**: 491-495, 1989.
- GOLDFRANK, L.R.; HOWLAND, M.A.; WEISMAN, R.S.; SMILKSTEIN, M.J.; KIRSTEIN, R.H. - Analgesics and over-the-counter preparations. In: GOLDFRANK, L.R., ed. - **Toxicology Emergencies**. 4 ed. California, Appleton & Lange, 1990. p.251-258.
- GREEN, W.B.; ECKERSON, M.L.; DEPA, R.; BROWN JR, B.R. - Covalent binding of oxidative metabolites to hepatic protein not detectable after exposure to sevoflurane or desflurane [abstract]. **Anesthesiology**, **81**: A437, 1994.
- HOLIDAY, D.A. & SMITH, F.R. - Clinical characteristics and biotransformation of sevoflurane in healthy human volunteers. **Anesthesiology**, **54**: 100-106, 1981.

- HUGHES, R.L.; CAMPBELL, D.; FITCH, W. - Effects of enflurane and halothane on liver blood flow and oxygen consumption in the greyhound. *Br. J. Anaesth.*, **52**: 1079-1086, 1980.
- HURSH, D.; GELMAN, S.; BRADLEY JR, E.L. - Hepatic oxygen supply during halothane and isoflurane anesthesia in guinea pigs. *Anesthesiology*, **67**: 701, 1987.
- INSEL, P.A. - Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: GILMAN, A.G., ed. - *The pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.617-657.
- JAMES, O.; ROBERTS, S.H.; DOUGLAS, A.P.; LESNA, M.; PULMAN, L.; SMITH, P.A. - Liver damage after paracetamol overdosage. Comparison of liver-function tests, fasting serum bile acids, and liver histology. *Lancet*, **27**: 579-581, 1975.
- JEE, R.C.; SIPES, I.G.; GANDOLFI, A.J.; BROWN JR, B.R. - Factors influencing halothane hepatotoxicity in the rat hypoxic model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **52**: 267-277, 1980.
- JICK, H. - Effects of aspirin and acetaminophen in gastrointestinal hemorrhage. *Arch. Intern. Med.*, **141**: 316-321, 1981.
- JOHNSON, G.K.& TOLMAN, K.G.- Chronic liver disease and acetaminophen. *An. Intern. Med.*, **87**: 302-304, 1977.
- JOLLOW, D.J.; MITCHELL, J.R.; POTTER, W.Z.; DAVIS, D.C.; GILLETTE, J.R.; BRODIE, B.B. - Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**: 195-202, 1973.
- JOLLOW, D.J.; THORGEIRSSON, S.S.; POTTER, W.Z.; HASHIMOTO, M.; MITCHELL, J.R. - Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacology*, **12**: 251-271, 1974.

- KENNA, J.G. & JONES, R.M. – The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesth. Analg.*, **81**: 51-66, 1995.
- KHARASCH, E.D. – Biotransformation of sevoflurane. *Anesth. Analg.*, **81**: 27-38, 1995.
- KRAAN, P.M.; VITTERS, E.L.; VRIES, B.J.; BERG, W.B.; PUTTE, L.B.A. – The effect of chronic paracetamol administration to rats on the glycosaminoglycan content of patellar cartilage. *Agents and Actions*, **29**: 218-223, 1990.
- LEWIS, R.B. & BLAIR, M. – Halothane hepatitis in a young child. *Br. J. Anaesth.*, **54**: 349-354, 1982.
- LIND, R.C.; GANDOLFI, A.J.; SIPES, G.; BROWN, B.R. – Comparison of the requirements for hepatic injury with halothane and enflurane in rats. *Anesth. Analg.*, **64**: 955-963, 1985.
- MALTZ, C. – Hepatic principles. In: GOLDFRANK, L.R., ed. – *Toxicology Emergencies*. 4 ed. California, Appleton & Lange, 1990. p.183-186.
- MAZE, M. – Hepatic physiology. In: MILLER, R.D., ed. – *Anesthesia*. 3 ed. New York, Churchill Livingstone, 1990. p.585-600.
- MAZE, M. & PRAGER, M.C. – Anesthesia and the liver. In: MILLER, R.D., ed. – *Anesthesia*. 3 ed. New York, Churchill Livingstone, 1990. p.1809-1828.
- MAZZE, R.I.; RICE, S.A.; BADEN, J.M. – Halothane, isoflurane and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats. *Anesthesiology*, **62**: 339-341, 1985.
- MCDONELL, W. – Respiratory system. In: THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J., ed. – *Veterinary Anesthesia*. 3 ed. Philadelphia, Williams & Wilkins, 1996. p.115-147.

- MCILROY, P.D.A.; FEE, J.P.H.; DUNDEE, J.W.; BLACK, G.W.; DOGGART, J.R.; JOHNSTON, H.M.L.; HAIRE, M.; NEILL, D.W.-Methodology of a prospective study of changes in liver enzyme concentrations following repeat anaesthetics. *Br. J. Anaesth.*, **51**: 1125-1132, 1979.
- MCLAIN, G.E.; SIPES, I.G.; BROWN JR, B.R. – An animal model of halothane hepatotoxicity: roles of enzyme induction and hypoxia. *Anesthesiology*, **51**: 321-326, 1979.
- MIELKE, H.C. – Comparative effects of aspirin and acetaminophen on hemostasis. *Arch. Intern. Med.*, **141**: 305-310, 1981.
- MITCHELL, J.R. & JOLLOW, D.J. – Metabolic activation of drugs to toxic substances. *Gastroenterology*, **68**: 392-410, 1975.
- MITCHELL, J.R.; JOLLOW, D.J.; POTTER, W.Z.; DAVIS, D.C.; GILLETTE, J.R.; BRODIE, B.B. – Acetaminophen induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**: 185-188, 1973.
- MITCHELL, J.R.; THORGEIRSON, S.S.; POHER, W.L. – Acetaminophen induced hepatic injury: protective role of glutathione in man and rationale therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**: 676-684, 1974.
- MONTGOMERY, D.C., ed. – *Design and Analyses of Experiments*. 3 ed. New York, John Wiley & Sons, 1991. 649p.
- MURRAY, J.M.; ROWLANDS, B.J.; TRINICK, T.R. – Indocyanine green clearance and hepatic function during and after prolonged anaesthesia: comparison of halothane with isoflurane. *Brit. J. Anaesth.*, **68**: 168-171, 1992.
- NAGANO, K.; GELMAN, S.; PARKS, D.; BRADLEY, E. – Hepatic circulation and oxygen-supply-uptake relationships after hepatic ischemic insult during anesthesia with volatile anesthetics and fentanyl in miniature pigs. *Anesth. Analg.*, **70**: 53-62, 1990.

- NAGANO, K.; GELMAN, S.; PARKS, D.; BRADLEY, E. – Hepatic circulation and oxygen-supply-uptake relationships after hepatic ischemic insult during anesthesia with volatile anesthetics and fentanyl in miniature pigs. *Anesth. Analg.*, **70**: 53-62, 1990.
- NEUBERGER, J.; & WILLIAMS, R. – Halothane anaesthesia and liver damage. *Br. Med. J.*, **289**: 1136-1139, 1984.
- NIMMO, W.S. – Effect of anaesthesia on gastric motility and emptying. *Br. J. Anaesth.*, **56**: 29-36, 1984.
- NIMMO, W.S. – Gastric emptying and anaesthesia. *Can. J. Anaesth.*, **36**: 45-47, 1989.
- NIMMO, W.S. – Pharmacology of agents that affect gastric secretion, emptying, and vomiting. *Can. J. Anaesth.*, **37**: 898-900, 1990.
- PAYNE, R.; THOMAS, J.; RAJ, P. – Dolor debido al cáncer. In: RAJ, P.P., ed. - *Tratamiento práctico del dolor*. 2 ed. Atlanta, Mosby, 1994. p.428-444.
- PESSAYRE, D.; DOLDER, A.; ARTIGOU, J.Y.; WANDSCHEER, J.C.; DESCATOIRE, V.; DEGOTT, C.; BENHAMOU, J.P. –Effect of fasting on metabolite-mediated hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology*, **77**: 264-271, 1979.
- PISCINATO, M.A.N.C.; SOUZA, M.E.J.; FRANCO, C.F.F., SILVA JR, O.C. – Constituintes bioquímicos e enzimáticos do soro. In: SILVA JR, O.C.S. & BEER, A., ed. - *Modelos de Pesquisa em Cirurgia Experimental*. São Paulo, Editora Robe, 1997. p.1-7.
- POTTER, W.Z.; DAVIS, D.C., MITCHELL, J.R.; JOLLOW, D.J.; GILLETTE, J.R.; BRODIE, B.B. – Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450 mediated covalent binding in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**: 203, 1973.
- PRESCOTT, L.F. –Reactive metabolites as a cause of hepatotoxicity. *Intern. J. Clin. Pharm. Res.*, **3**: 437-441, 1983.

- PRESCOTT, L.F.; WRIGHT, N.; ROSCOE, P.; BROWN, S.S. – Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet*, 1: 519-522, 1971.
- REHDER, K.; FORBES, J.; ALTER, H.; HESSLER, O.; STIER, A. – Halothane biotransformation in man: a quantitative study. *Anesthesiology*, 28: 711-715, 1967.
- REICHLING, J.J. & KAPLAN, M.M. – Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig. Dis. Sci.*, 33: 1601-1614, 1988.
- REILLY, C.S.; WOOD, A.J.J.; KOSHAKJI, R.P.; WOOD, M. – The effect of halothane on drug disposition: contribution of changes in intrinsic drug metabolizing capacity and hepatic blood flow. *Anesthesiology*, 63: 70-76, 1985.
- RINGLER, D.H. & DABICH, L. - Hematology and clinical biochemistry. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H., ed. - *The Laboratory Rat*. 1 ed. Orlando, Academic Press. 1979. p.105-121.
- RUMACK, B.H. – Acetaminophen overdose in children and adolescents. *Pediatric Clin. North Am.*, 33: 691-701, 1986.
- SARAIVA, R.A.; LUNN, J.N.; MAPLESON, W.W.; WILLIS, B.A.; FRANCE, J.M. – Adiposity and the pharmacokinetics of halothane. *Anaesthesia*, 32: 240-246, 1977.
- SCHEMEL, W.H. – Unexpected hepatic dysfunction found by multiple laboratory screening. *Anesth. Analg.*, 55: 810-812, 1976.
- SETTIPANE, G.A. – Adverse reactions to aspirin and related drugs. *Arch. Intern. Med.*, 141: 328-332, 1981.
- SHINGU, K.; EGER II, E.I.; JOHNSON, B.H. – Hypoxia per se can produce hepatic damage without death in rats. *Anesth. Analg.*, 61: 820-823, 1982a.

- SHINGU, K.; EGER II, E.I.; JOHNSON, B.H. – Hypoxia may be more important than reductive metabolism in halothane induced hepatic injury. *Anesth. Analg.*, **61**: 824-827, 1982b.
- SOLBERG, H.E., ed. – Establishment and use of reference values. - *Tietz Text Book of Clinical Chemistry*. 2 ed.. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1994. p.454-484.
- STEFFEY, E.P. – Inhalation anesthetics. In: THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J., ed. - *Veterinary Anesthesia*. 3 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996. p.297-329,
- STEVENS, W.C. & KINGSTON, H.G.G. – Inhalation anesthesia. In: BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K., ed.- *Clinical Anesthesia*. 3 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.359-383.
- STOELTING, R.K., ed. – Anestésicos Inalatórios. - *Manual de Farmacologia & Fisiologia na Prática Anestésica*. 1 ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. p.31-51.
- STOELTING, R.R.; BLITT, C.D.; COHEN, P.J. – Hepatic dysfunction after isoflurane anesthesia. *Anesth. Analg.*, **66**: 147, 1987.
- STRUM, D.P.; EGER II, E.I.; JOHNSON, B.H.; STEFFEY, E.P.; FERRELL, L.D. – Toxicity of sevoflurane in rats. *Anesth. Analg.*, **66**: 769-763, 1987.
- THOMSON, I.A.; FITCH, W.; HUGHES, R.L.; CAMPBELL, D. – Effect of increased concentrations of carbon dioxide during halothane anaesthesia on liver blood flow and hepatic oxygen consumption. *Br. J. Anaesth.*, **55**: 123, 1983.
- TOLEDO, C.F. & BORGES, D.R. – Doença hepática acetaminofeno-induzida: um modelo de hepatotoxicidade. *Ver. Ass. Med. Brasil.*, **38**: 153-158, 1992.
- TROWELL, J.; PETO, R.; SMITH, A.C. – Controlled trial of repeated halothane anaesthetics in patients with carcinoma of the uterine cervix teated with radium. *Lancet*, **1**: 821-823, 1975.

- TRUMPER, L.; GIRARDI, G.; ELIAS, M.M. – Acetaminophen nephrotoxicity in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, **66**: 107-111, 1992.
- VAN DYKE, R. – Effect of fasting on anesthetic-associated liver toxicity. *Anesthesiology*, **44**: A181, 1981.
- VAN DYKE, R. – Hepatic centrilobular necrosis in rats after exposure to halothane, enflurane or isoflurane. *Anesth. Analg.*, **61**: 812-819, 1982.
- VITEZ, T.S.; WHITE, P.F.; EGER II, E.I. – Effects of hypothermia on halothane MAC and isoflurane MAC in the rat. *Anesthesiology*, **41**: 80-81, 1974.
- WAIZER, P.R.; BAEZ, S.; ORKIN, L.R. – A method for determining minimum alveolar concentration of anesthetic in the rat. *Anesthesiology*, **39**: 394-397, 1973.
- WALTON, B.; SIMPSON, B.R.; STRUNIN, L.; DONIACH, D.; PERRIN, J.; APPELYARD, A.J. – Unexplained hepatitis following halothane. *Br. Med. J.*, **1**: 1171-1176, 1976.
- WAYNFORTH, H.B., ed. – *Experimental and surgical technique in the rat*. 1 ed. New York, Academic Press, 1980. 268p.
- WHITCOMB, D.C. & BLOCK, G.D. – Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA*, **272**: 1845-1850, 1994.
- WHITE, P.F.; JOHNSTON, R.R.; EGER II, E.I. – Determination of anesthetic requirement in rats. *Anesthesiology*, **40**: 52-57, 1974.
- WIDGER, L.A.; GANDOLFI, A.J.; VAN DYKE, R.A. – Hypoxia and halothane metabolism in vivo: release of inorganic fluoride and halothane metabolite binding to cellular constituents. *Anesthesiology*, **44**: 197-201, 1976.
- WOOD, M. – Inhalational anesthetic agents. In: WOOD, M & WOOD, A.J.J., ed – *Drugs and Anesthesia: Pharmacology for Anesthesiologists*. 2 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1990. p.227-270.

- WOOD, M. & WOOD, A.J.J. – Contrasting effects of halothane, isoflurane and enflurane on in vivo drug metabolism in the rat. *Anesth. Analg.*, **63**: 709-714, 1984.
- WRIGHT, R.; EADE, O.E.; CHRISHOM, M.; HAWKSLEY, M.; MOLES, T.M.; GARDNER, M.J. – Controlled prospective study of the effect on liver function to multiple exposures to halothane. *Lancet*, **1**: 817-820, 1975.
- ZARIC, D.; LARSEN, S.F.; JACOBSEN, E.; OLESEN, K.H.; RANEK, L. – Halothane hepatitis in a prospective study of postoperative complications. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **30**: 529-532, 1986.
- ZIMMERMAN, H. – Even isoflurane. *Hepatology*, **13**: 1251-1253, 1991.
- ZIMMERMAN, H.F. & ISHAK, K.G. – Hepatic injury due to drugs and toxins. In: SWEEN, R.N.M.; ANTHONY, P.P.; SCHEUER, P.J.; BURT, A.D.; PORTMANN, B.C., ed. - *Pathology of the liver*. 3 ed. London, Churchill Livingstone, 1994. p.563-633.

10. Anexos

Tabela 1: Valores médios e respectivos desvios padrões do peso dos ratos, expressos em gramas.

GRUPOS	PESO	$\bar{X} \pm DP$
G1		271,92 \pm 8,33
G2		272,46 \pm 6,76
G3		271,97 \pm 6,63
G4		276,17 \pm 4,30
G5		275,77 \pm 9,23
G6		275,44 \pm 7,00
G7		274,40 \pm 6,04
VRL		276,85 \pm 5,09

VRL= valores de referência laboratoriais.

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 2: Valores médios e respectivos desvios padrões, expressos em °C, das temperaturas dos ratos e do recipiente nos grupos 1 (halotano), 2 (isoflurano), 3 (sevoflurano), 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol) e 6 (sevoflurano e paracetamol).

T° Grupos	T° ratos	T° recipiente
G1	37,10 ± 0,42	27,80 ± 0,27
G2	36,80 ± 0,57	27,40 ± 0,22
G3	37,00 ± 0,50	27,30 ± 0,67
G4	37,30 ± 0,45	27,60 ± 0,42
G5	37,00 ± 0,50	27,40 ± 0,42
G6	37,20 ± 0,45	27,20 ± 0,45

T° = temperatura.

Tabela 3: Valores de referência laboratoriais individuais das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT, expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	95	42	284	1
2	99	47	398	1
3	90	50	321	1
4	100	47	371	1
5	80	48	376	1
6	71	49	379	1
7	89	51	309	1
8	73	46	309	1
9	88	45	351	1
10	100	45	324	1
11	89	51	362	1
12	90	43	390	0
13	65	50	387	1
14	69	45	394	1
15	73	44	317	1
16	92	51	287	0
17	100	50	370	1
18	99	44	385	1
19	84	42	273	0
20	84	46	373	1
21	87	50	330	0
22	72	40	370	1
23	89	50	330	1
24	99	52	360	0
25	82	40	382	1
26	84	42	351	1
27	81	45	300	1
28	85	49	370	1
29	87	50	372	0
30	86	47	362	1
31	75	50	375	1
32	82	47	324	1
33	83	49	367	1
34	79	54	319	0
35	80	52	273	0
36	77	52	353	1
37	78	34	373	1
38	82	54	36	1

Tabela 4: Valores médios ± 1 e 2 DP dos valores de referência laboratoriais das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA, GGT e respectivos intervalos de referência laboratoriais. Os resultados são expressos em U/L.

VRL/IRL Variáveis	VRL ($\bar{X} \pm DP$)	VRL ($\bar{X} \pm 2 DP$)	IRL
AST	84,68 \pm 9,27	84,68 \pm 18,54	66 – 103
ALT	47,18 \pm 4,31	47,18 \pm 8,62	38 – 56
FA	348,28 \pm 35,50	348,28 \pm 71,00	277 – 419
GGT	0,79 \pm 0,41	0,79 \pm 0,82	0 – 2

VRL = valores de referência laboratoriais.

IRL = intervalos de referência laboratoriais.

DP = desvio padrão.

\bar{X} = média.

Tabela 5: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT do grupo 1 (halotano). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	114	54	326	2
2	96	46	472	2
3	93	49	382	2
4	94	50	425	2
5	108	63	367	2
6	132	58	373	3
7	111	56	365	2
8	104	53	439	3
$\bar{X} \pm DP$	106,50±13,01	53,62±5,42	393,62±47,58	2,25±0,46

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 6: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST ALT, FA e GGT do grupo 2 (isoflurano). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	109	52	403	2
2	113	48	357	2
3	124	45	422	1
4	119	50	372	2
5	109	54	471	2
6	133	42	333	2
7	136	62	432	3
8	110	59	478	3
X ± DP	119,12±10,87	51,50±6,76	408,50±52,35	2,13±0,64

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 7: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT do grupo 3 (sevoflurano). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	71	53	397	1
2	86	52	300	1
3	93	27	343	0
4	99	27	345	0
5	124	66	344	1
6	119	65	364	1
7	88	55	336	1
8	96	68	339	1
X ± DP	97,00±17,37	51,62±16,39	346,00±27,27	0,75±0,46

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 8: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT do grupo 4 (halotano e paracetamol). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	104	55	359	2
2	161	71	304	2
3	137	60	271	2
4	112	70	460	2
5	135	69	337	2
6	111	81	446	2
7	121	62	309	2
8	101	99	320	2
X ± DP	122,75±20,35	70,87±13,87	350,75±68,14	2

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 9: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT do grupo 5 (isoflurano e paracetamol). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	136	78	325	1
2	100	63	294	1
3	94	53	536	2
4	111	70	360	2
5	90	58	344	2
6	119	74	364	2
7	180	49	314	2
8	93	52	278	2
$\bar{X} \pm DP$	115,37±30,41	62,12±10,89	351,87±80,30	1,75±0,46

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 10: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas do grupo 6 (sevoflurano e paracetamol). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	100	53	368	1
2	100	49	443	1
3	111	65	359	1
4	101	50	249	1
5	96	49	367	1
6	92	41	413	1
7	87	40	365	1
8	80	56	443	1
X ± DP	95,87±9,52	50,37±8,03	375,87±62,14	1

X = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 11: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das variáveis bioquímicas AST, ALT, FA e GGT do grupo 7 (paracetamol). Os resultados são expressos em U/L.

VARIÁVEIS RATOS	AST	ALT	FA	GGT
1	108	56	303	0
2	119	49	347	0
3	107	64	346	1
4	89	62	332	1
5	89	57	372	1
6	100	54	311	1
7	103	62	396	1
8	90	51	313	1
$\bar{X} \pm DP$	100,62±10,84	56,88±5,46	340,00±32,18	0,75±0,46

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 12: Valores de p do teste t de Student, obtidos de comparações entre as variáveis bioquímicas dos grupos estudados.

VARIÁVEIS \ GRUPOS	AST	ALT	FA	GGT
G1 vs G2	0,053	0,499	0,561	0,661
G1 vs G3	0,235	0,7479	0,561	0,00001*
G1 vs G4	0,077	0,005*	0,166	0,148
G1 vs G7	0,342	0,252	0,019*	0,00001*
G2 vs G3	0,008*	0,984	0,009*	0,0002*
G2 vs G5	0,747	0,034*	0,116	0,201
G2 vs G7	0,004*	0,102	0,007*	0,0002*
G3 vs G6	0,874	0,849	0,233	0,148
G3 vs G7	0,624	0,404	0,693	1
G4 vs G5	0,577	0,182	0,976	0,148
G4 vs G6	0,004*	0,002*	0,453	0,0004*
G4 vs G7	0,016*	0,018*	0,692	0,000002*
G5 vs G6	0,105	0,027*	0,514	0,0004*
G5 vs G7	0,217	0,243	0,703	0,0007*
G6 vs G7	0,367	0,079	0,169	0,148

* $p < 0,05$

vs = versus.

G = Grupos

Tabela 13: Valores individuais, respectivas médias e desvios padrões das concentrações plasmáticas de paracetamol dos grupos 4 (halotano e paracetamol), 5 (isoflurano e paracetamol), 6 (sevoflurano e paracetamol) e 7 (paracetamol). Os resultados são expressos em $\mu\text{g/ml}$.

Grupos	G4	G5	G6	G7
Ratos				
1	228,11	191,72	183,65	157,42
2	213,80	242,39	152,56	168,98
3	220,67	221,54	171,32	168,34
4	197,08	202,30	185,18	160,06
5	233,93	209,82	183,72	142,83
6	176,43	201,83	181,73	152,06
7	183,71	182,36	179,78	157,37
8	198,75	188,00	167,14	153,84
$\bar{X} \pm \text{DP}$	$206,56 \pm 20,86$	$204,99 \pm 19,60$	$175,63 \pm 11,33$	$157,61 \pm 8,57$

\bar{X} = média.

DP = desvio padrão.

Tabela 14: Frequência, em valores percentuais (%), do grau de necrose e número de animais correspondente, em cada grupo.

Grupos	Ausente		Leve		Moderado		Intenso	
	N	%	N	%	N	%	N	%
G1	-	-	4	50,0	4	50,0	-	-
G2	2	25,0	6	75,0	-	-	-	-
G3	-	-	8	100,0	-	-	-	-
G4	2	25,0	4	50,0	2	25,0	-	-
G5	2	25,0	6	75,0	-	-	-	-
G6	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-
G7	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-

N = número de ratos.

- = ausência.

Tabela 15: Frequência, em valores percentuais (%), do grau de vacuolização citoplasmática e número de animais correspondente, em cada grupo.

Grupos \ Grau de VC	Ausente		Leve		Moderado		Intenso	
	N	%	N	%	N	%	N	%
G1	-	-	7	87,5	1	12,5	-	-
G2	1	12,5	6	75,0	1	12,5	-	-
G3	3	37,5	3	37,5	2	25,0	-	-
G4	3	37,5	-	-	5	62,5	-	-
G5	3	37,5	4	50,0	1	12,5	-	-
G6	2	25,0	2	25,0	4	50,0	-	-
G7	7	87,5	1	12,5	-	-	-	-

N = número de ratos.

- = ausência.

VC = vacuolização citoplasmática.

Tabela 16: Frequência, em valores percentuais (%), do grau de congestão e número de animais correspondente, em cada grupo.

Grau de congestão Grupos	Ausente		Leve		Moderado		Intenso	
	N	%	N	%	N	%	N	%
G1	1	12,5	7	87,5	-	-	-	-
G2	6	75,0	2	25,0	-	-	-	-
G3	5	62,5	3	37,5	-	-	-	-
G4	-	-	3	37,5	5	62,5	-	-
G5	-	-	6	75,0	2	25,0	-	-
G6	-	-	6	75,0	2	25,0	-	-
G7	3	37,5	4	50,0	1	12,5	-	-

N = número de ratos.

- = ausência.

Tabela 17: Frequência, em valores percentuais (%), do grau de reação inflamatória lobular e número de animais correspondente, em cada grupo.

Grupos	Grau de RIL		Ausente		Leve		Moderado		Intenso	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
G1	-	-	8	100,0	-	-	-	-	-	-
G2	2	25,0	6	75,0	-	-	-	-	-	-
G3	2	25,0	6	75,0	-	-	-	-	-	-
G4	-	-	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-
G5	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-	-	-
G6	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-	-	-
G7	3	37,5	5	62,5	-	-	-	-	-	-

RIL = reação inflamatória lobular.

N = número de ratos.

- = ausência.

Tabela 18: Frequência, em valores percentuais (%), do grau de reação inflamatória portal e número de animais correspondente, em cada grupo.

Grupos	Grau de RIP	Ausente		Leve		Moderado		Intenso	
		N	%	N	%	N	%	N	%
G1		5	62,5	3	37,5	-	-	-	-
G2		7	87,5	1	12,5	-	-	-	-
G3		6	75,0	2	25,0	-	-	-	-
G4		5	62,5	3	37,5	-	-	-	-
G5		8	100,0	-	-	-	-	-	-
G6		8	100,0	-	-	-	-	-	-
G7		7	87,5	1	12,5	-	-	-	-

RIP = reação inflamatória portal.

N = número de ratos.

- = ausência.

Tabela 19: Valores de p do teste de Wilcoxon, obtidos de comparações entre as variáveis histológicas dos grupos estudados.

Tipo de acometimento Grupos	Necrose	VC	Congest.	RIL	RIP
G1 vs G2	0,017*	0,643	0,017*	0,170	0,294
G1 vs G3	0,030*	0,465	0,052	0,170	0,647
G1 vs G4	0,183	0,571	0,009*	0,010*	1,0
G1 vs G7	0,012*	0,001*	0,605	0,074	0,294
G2 vs G3	0,170	0,725	0,647	1,0	0,587
G2 vs G5	1,0	0,427	0,003*	0,647	0,381
G2 vs G7	0,647	0,004*	0,135	0,647	1,0
G3 vs G6	0,074	0,403	0,008*	0,647	0,170
G3 vs G7	0,074	0,044*	0,288	0,647	0,587
G4 vs G5	0,502	0,288	0,160	0,006*	0,074
G4 vs G6	0,316	0,953	0,160	0,006*	0,074
G4 vs G7	0,316	0,026*	0,002*	0,006*	0,294
G5 vs G6	0,647	0,242	1,0	1,0	1,0
G5 vs G7	0,647	0,049*	0,128	1,0	0,381
G6 vs G7	1,0	0,011*	0,128	1,0	0,381

p < 0,05

vs = versus.

G = Grupos